

**DAS ZELLULÄRE VERHALTEN VON
CYCLISCHEM ADENOSIN-3':5'-MONOPHOSPHAT
NACH HYDROKINETISCHER UND EKBOLISCHER
STIMULIERUNG DES HUNDEPANKREAS**

DR. MED. DENT. BERTHOLD LIEBIG

1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0062

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. E. Buchborn

Das zelluläre Verhalten
von cyclischem Adenosin-3':5'-monophosphat
nach hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung
des Hundepankreas

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. dent. Berthold Liebig
aus Moosham/Mühlendorf a. Inn

München
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Teufel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Oktober 1987

Z u s a m m e n f a s s u n g

Dr. med. dent. Berthold Liebig

Das zelluläre Verhalten von cyclischem Adenosin-3':5'-monophosphat nach hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung des Hundepankreas

Durch Untersuchungen in vivo und am isoliert perfundierten Hundepankreas soll die Bedeutung von cyclischem Adenosin 3':5'-monophosphat als zellulärer Vermittler hydrokinetischer und insbesondere ekbolischer Sekretagoga geklärt werden.

Sowohl Sekretin als auch die ekbolischen Sekretagoga Cholecystokinin, Acetylcholin und Caerulein führten in gleicher Weise innerhalb von 30 - 60 Sekunden zu einer deutlichen Zunahme der zellulären cAMP-Konzentration. Nach Stimulierung mit Sekretin ging dieser Anstieg der Saftsekretion voraus, nach ekbolischen Sekretagoga war er mit dem Beginn der Enzymfreisetzung koinzident. Das Maximum an cytoplasmatischem cAMP wurde nach 1 - 3 Minuten erreicht und fiel mit dem exkretorischen Maximum zusammen. Es zeigte sich jedoch keine strenge Dosis-Wirkungsbeziehung zu den hydrokinetischen und ekbolischen Sekretagoga.

Während der zeitliche Ablauf zellulärer cAMP-Veränderungen am isolierten Pankreas weitgehend dem Sekretionsverlauf entsprach, zeigten sich in vivo deutliche Abweichungen. In Bezug auf die Stimulierung mit Sekretin zeigte das cytoplasmatische cAMP-Verhalten nach ekbolischen Sekretagoga keine wesentlichen Unterschiede.

Auch im calciumfreien Medium bei vollständiger Hemmung der exkretorischen Zellfunktion kam es nach Stimulierung mit hydrokinetischen und ekbolischen Sekretagoga zu einem raschen Anstieg der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration.

So zeigt das zelluläre Verhalten von cAMP am Pankreas des Hundes nach Gabe von Sekretin bzw. Cholecystokinin, Acetylcholin und Caerulein eindeutig, daß cAMP sowohl bei der durch ekbolische Sekretagoga stimulierten Enzymfreisetzung azinärer Zellen, als auch bei der sekretinabhängigen Elektrolyt- und Wassersekretion ductulärer Zellen eine intrazelluläre Vermittlerfunktion besitzt. Die endogene Freisetzung von cAMP hängt nicht vom Vorhandensein von extrazellulärem Calcium ab. Letzteres scheint jedoch für die Enzymfreisetzung von Bedeutung zu sein. Unterschiede zwischen dem cytoplasmatischen Verhalten von cAMP und dem jeweiligen Sekretionsverlauf deuten auf weitere Regulationsmechanismen für die zelluläre Homeostase von cAMP hin.

1914-1915

1916-1917

1918-1919

MEINEN ELTERN

1920-1921

1922-1923

1924-1925

1926-1927

1928-1929

1930-1931

1932-1933

1934-1935

1936-1937

1938-1939

1940-1941

1942-1943

1944-1945

1946-1947

1948-1949

1950-1951

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODIK	4
1. Operationstechnik	5
2. Organperfusion in vitro	7
3. Versuche in vivo	10
4. Untersuchungsmaterial	10
5. Verwendete Sekretagoga	11
6. Bestimmungsmethoden	12
ERGEBNISSE	16
1. Das zelluläre cAMP-Verhalten nach Sekretingabe	16
2. Das zelluläre cAMP-Verhalten nach ekbolischen Sekretagoga	23
3. Das zelluläre Verhalten von cAMP nach ekbolischer Stimulierung im calciumfreien Medium.	34
DISKUSSION	39
ZUSAMMENFASSUNG	51
LITERATUR	53

ABKÜRZUNGEN

ACH	Acetylcholin
BE	Basenexzeß, Gesamtpufferbase
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
CCK	Cholecystokinin / Pankreozymin
cGMP	cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat
Ci	Curie
CU	clinical units
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
i.a.	intraarteriell
I.D.U.	Ivy dog units
I.E.	internationale Einheiten
i.v.	intravenös
KHB	KREBS-HENSELEIT-Hydrogenkarbonatlosung
n	Zahl der Experimente
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sn	Sekretin
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid

EINLEITUNG

Die Bedeutung von cAMP bei der intrazellulären Vermittlung hydrokinetischer und ekbolischer Sekretagoga ist trotz mannigfaltiger Einzelbefunde noch ungeklärt. Sie stellt ein zentrales Problem vieler Untersuchungen am exokrinen Pankreas dar.

SUTHERLAND et al. entdeckten 1960 (58), daß das cyclische Adenosin - 3':5'-monophosphat bei der Glykogenolyse der Leber als intrazellulärer Vermittler von Glukagon und Adrenalin fungiert. Danach hat es sich weiterhin für zahlreiche Peptidhormone und Neurotransmitter verschiedenster Zellsysteme und Spezies als "second messenger" erwiesen. So gilt diese sekundäre Vermittlerrolle von cAMP für hydrokinetische Sekretagoga (Sn, VIP) nach den, an Pankreasteilen der Ratte und des Meerschweinchens, erhaltenen Ergebnisse als weitgehend gesichert (4, 9, 23). Die allgemeine Bedeutung einer Zunahme der Enzymfreisetzung und der cAMP-Erhöhung in isolierten Azinuszellen oben genannter Spezies nach Gabe von Sekretin und vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP) bleibt jedoch unklar. Bei den meisten anderen Tierpezies haben diese Substanzen nur eine geringe oder keine ekbolische Wirkung gezeigt (65, 66).

An verschiedenen Versuchsmodellen konnte die potenzierende Wirkung von exogenen cAMP-Analoga auf die Enzymsekretion nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Vermittlerfunktion für ekbolische Sekretagoga hindeutet (2, 30, 35, 38,

47, 55). Die Möglichkeit der Vermittlerfunktion von cAMP an den Azinuszellen für die Enzymfreisetzung wird jedoch durch die im Verhältnis zur Freisetzung nach Cholecystokinin (CCK), Caerulein und Acetylcholin (ACh) geringeren Wirkung in Frage gestellt. Bei verschiedenen Spezies ließ sich die ekbolische Wirkung des cAMP nicht nachweisen (3, 6, 28, 30).

Weiterhin zeigte die cytoplasmatische Konzentration von cAMP im Gegensatz zu cGMP an isolierten Azinuszellen und Pankreasfragmenten der Ratte und des Meerschweinchens nach Gabe von ekbolischen Sekretagoga keine Zunahme (1, 11, 13, 19, 23, 26, 29, 41, 48, 52). Diese Erkenntnisse führten zur Annahme, daß das Vermittlerprinzip ekbolischer Sekretagoga allein vom cGMP abhängt (25). An der Katze (7) zeigte sich jedoch in vivo und in vitro eine deutliche zelluläre cAMP-Antwort in zeitlicher Übereinstimmung mit der stimulierten Enzymfreisetzung. Dasselbe war bei höheren CCK-Konzentrationen oder in Gegenwart von Theophyllin auch an der Ratte nachweisbar (19, 30, 34, 48). Zum anderen führten CCK bzw. CCK-Analoga, nicht aber Acetylcholin, an Homogenaten isolierter Azinuszellen der Ratte und des Meerschweinchens zu einer Aktivierung der Adenylcyclase, ohne die Guanylcyclase zu beeinflussen. An intakten Azinuszellen kam es, im Gegensatz zu einem deutlichen Anstieg von cGMP, überraschenderweise zu keiner Änderung der cAMP-Konzentration (2, 11, 33, 40, 41, 43, 54, 57, 59).

Im Gegensatz zu obigen Aussagen gelang es DE PONT et.al. (18) an 5 verschiedenen Spezies eine Aktivierung der Adenylcyclase durch Acetylcholin nachzuweisen. Ferner läßt sich auch aus der vom cAMP abhängigen Proteinkinaseaktivität auf eine mögliche Vermittlerfunktion dieser Substanz bei der azinären Enzymfreisetzung schließen (11, 61).

Trotz der bisher ungesicherten Veränderungen zellulärer cAMP-Konzentrationen nach ekbolischen Sekretagoga existieren eine Reihe Einflußmöglichkeiten von cAMP bei den Enzymfreisetzungen. Die Mehrzahl der Versuche und Untersuchungen wurde an isolierten Zellen und Fragmenten des Pankreas durchgeführt. Es fand sich jedoch dabei eine reduzierte Stimulierbarkeit, verminderte Adenylcyclaseaktivität und eine Abnahme der Enzymfreisetzung gegenüber den in vivo gefundenen Ergebnissen (9, 31, 34).

Da einerseits bisher keinerlei detaillierte Beobachtungen über das Verhalten cyclischer Nukleotide im Gewebe vorliegen (16, 17), andererseits sich Saft- und Enzymsekretion getrennt erfassen lassen und das Hundepankreas historisch ein bedeutendes Modell sekretionsphysiologischer Untersuchungen darstellt, soll in dieser Arbeit das zelluläre cAMP-Verhalten nach Stimulation mit hydrokinetischen und ekbolischen Sekretagoga sowohl in vitro, am isoliert perfundierten Hundepankreas, als auch in vivo untersucht und gegenübergestellt werden.



MATERIAL UND METHODIK

Das isolierte Hundepankreas wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. So werden durch die ex vivo Perfusion des isolierten Organs, das im Gegensatz zu vielen Perfusionsmodellen auch vom eng verbundenen Duodenum abgetrennt wurde, zusätzliche Einflüsse durch eine mögliche Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern, sowie organunabhängigen regulatorischen und hämodynamischen Mechanismen ausgeschaltet und definierte Versuchsbedingungen geschaffen. Da Mensch und Hund analoge Sekretionsverhalten zeigen, wurden sämtliche Untersuchungen an Bastardhunden mit einem Körpergewicht zwischen 20 bis 40 kg nach 12-stündiger Nahrungskarenz durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte intravenös mit 15-20 mg Pentobarbital pro Kilogramm Körpergewicht. Nach der Intubation atmeten die Tiere spontan mit Sauerstoff (4 l/min) angereicherte Raumluft. Nach Darstellung der Arteria und Vena femoralis in der Leistengegend wurden 2 mal 200 ml arterielles Blut für die Vor- und Versuchsperiode abgenommen und mit 200 I.E. Heparin und 15 g/ml Gentamycin zur Vermeidung von Bakterienwachstum versetzt.

Über einen in die Vena femoralis gelegten Katheter wurden fortlaufend die Volumenverluste mit Ringerlösung und 1,4%iger NaHCO_3 -Lösung ausgeglichen. Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck, sowie Standardbikarbonat, pH-Wert und BE wurden regelmäßig nach der Mikromethode von Astrup (BMS 2, BEU 1, PHM 71 - Fa. Hillerkus, Krefeld) kontrol-

liert und dementsprechend reguliert. Die Untersuchungen erfolgten in vivo am narkotisierten, laparotomierten Hund bzw. ex vivo am, mit autologem Blut rezirkulierend oder mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Pufferlösung (KHB) offen durchströmten, isolierten Organ.

1. Operationstechnik

Nach medianer Laparatomie, totaler Gastrektomie und Splenektomie wurde die Bauchspeicheldrüse freigelegt, das eng mit dem Pankreaskopf verbundene Duodenum nach Unterbindung der einzelnen Gefäße sorgfältig abpräpariert und in den Ductus pancreaticus major eine PVC-Sonde (Außendurchmesser 1.5 mm) eingelegt. Der Ductus accessorius wurde, wie sämtliche Gefäßverbindungen zum Omentum minus et majus, unterbunden. Danach erfolgte die Darstellung des Hauptstammes der Arteria und Vena mesenterica superior sowie die Unterbindung der mesenterialen und mesocolischen Gefäße distal der Arteria und Vena pancreaticoduodenalis inferior. Die Arteria lienalis und Arteria mesenterica superior wurden distal des Abganges der unteren Pankreasarterie kanüliert und retrograd mit oxygeniertem, präoperativ entnommenem heparinisierten Blut über ein Perfusionssystem durchströmt (Abb. 1). Unmittelbar nach Perfusionsbeginn wurden die Arteria coeliaca und Arteria mesenterica superior am aortalen Abgang durchtrennt. Der venöse Rückfluß erfolgte nach Unterbindung des Leberhilus retrograd über die Vena

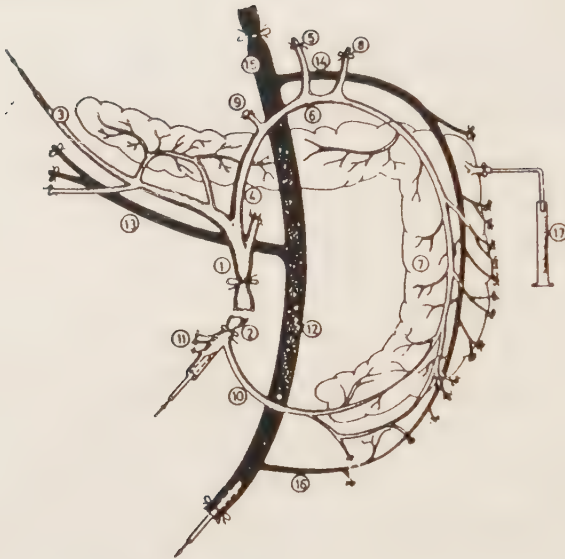


Abb. 1: Schematische Darstellung des präparierten Hundepankreas mit Gefäßversorgung. (dorsale Ansicht)

- 1) Truncus coeliacus
- 2) A. mesenterica superior
- 3) A. lienalis
- 4) A. gastrica sinistra
- 5) A. gastroepiploica dextra
- 6) A. gastroduodenalis
- 7) A. pancreaticoduodenalis superior
- 8) A. gastrica dextra
- 9) A. hepatica propria, von der A. hepatica communis abgehend
- 10) A. pancreaticoduodenalis inferior
- 11) Aa. ileocolicales
- 12) V. mesenterica superior
- 13) V. lienalis
- 14) V. gastroduodenalis
- 15) V. portae
- 16) V. pancreaticoduodenalis inferior
- 17) sondierter Ductus pancreaticus major.

mesenterica superior und über einen Polyäthylenkatheter zurück in das Blutreservoir des geschlossenen Perfusionskreislaufes. Nach möglichst atraumatischer Lösung des Organs wurde das Pankreas in eine Perfusionskammer gelegt, wo es vor Auskühlung und Austrocknung geschützt war. Die Operationsdauer betrug in der Regel 2-3 Stunden.

2. Organperfusion in vitro

Das bereits in situ rezirkulierend durchströmte Organ wurde in eine eigene Plexiglaskammer innerhalb des thermoregulierten Perfusionsgehäuses mit 38 Grad Celsius gebracht (Abb. 2). Vor dem eigentlichen Versuch lag eine 30-minütige Vorperfusion mit 200 ml Blut, während dieser wurde die Temperatur, der Perfusionsdruck, das Minutenvolumen, der pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck, der Bicarbonat- und Glukosegehalt auf die Versuchsbedingungen eingestellt. Eine Rollenpumpe (Fa. Deuster, München) sorgte für ein konstantes physiologisches Minutenvolumen von 0,5 - 0,8 ml/g Feuchtgewicht des Organes bei einem Perfusionsdruck von 60 - 100 mm Hg. Eine eingebaute Luftfalle verhinderte eine Embolie im Drüsengewebe. Das aus der Vena mesenterica superior fließende Blut gelangte zurück in das Vorratsgefäß, wo es mit dem bereits oxygenierten Blut mittels eines Magnetrührers vermischt wurde. Ein Y-Stück stellte die Verbindung zwischen dem arteriellen Schenkel des Blutkreislaufes und dem zweiten Blutkreislauf für Versuche am geschlossenen

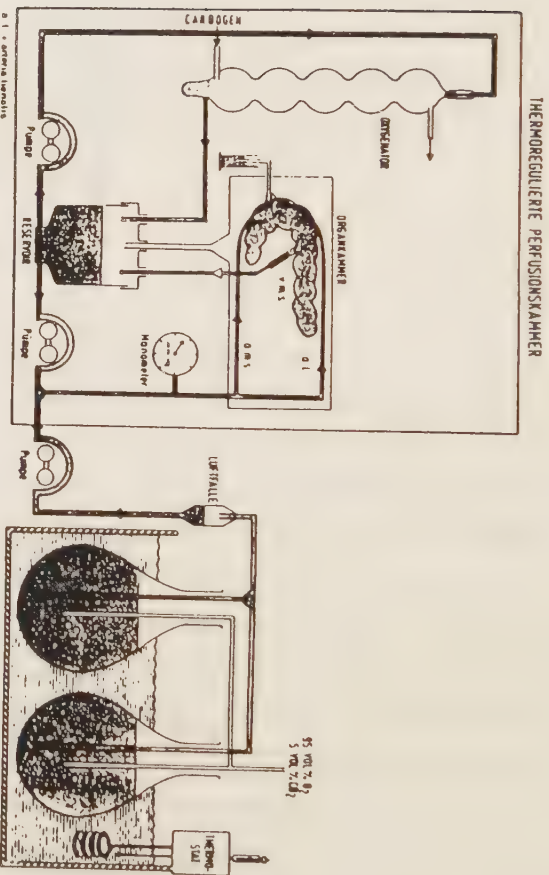


Abb. 2: Perfusionsanordnung

Linke Bildhälfte: Anordnung für die rezirkulierende Organdurchströmung.
 Organ und Oxygenierungskreislauf sind getrennt.
 Rechte Bildhälfte: Thermoreguliertes Wasserbad für die Vorratsgefäße des Perfusionsmediums (KREBS-HENSELEIT-Bikarbonat-Pufferlösung) für die offene, nicht rezirkulierende Durchströmung. Oxygenierung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂).

System sowie dem KHB-Behälter für die offene Durchströmung her. Je nach Fragestellung wurde das isolierte Pankreas in einem offenen System mit hämoglobinfreien künstlichen Lösungen oder in einem geschlossenen Kreislauf mit dem anfangs entnommenen und heparinisierten Hundeblut perfundiert. Die Begasung des rezirkulierenden Blutes erfolgte im Gegenstromprinzip in einem Oberflächenoxygenator mit einem Carbogengemisch aus 95 Vol. % Sauerstoff und 5 Vol. % Kohlendioxid. Blutgasanalysen und Bestimmungen des Säure-Basen-Status wurden regelmäßig durchgeführt und je nach Werten mit 2 - 4 mEq/h Natriumbicarbonatlösung konstant gehalten. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf den Wert 7,4. Eine Infusionspumpe sorgte für die kontinuierliche Zufuhr von D-Glucose (240 mg/h). Entsprechend der Saftsekretion und den Veränderungen des Hämatokrits wurde Vollelektrolytlösung zugesetzt und somit das Perfusionsvolumen von 200 ml aufrecht erhalten.

Bei dem Perfusionsmedium im offenen System handelte es sich um Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung (KHB) mit folgender Zusammensetzung: NaCl 125 mM, KCl 4,3 mM, NaHCO_3 25 mM, MgCl_2 1,0 mM, CaCl_2 1,25 mM, NaH_2PO_4 1,0 mM, D-Glucose 5 mM und Dextran 60 6g/dl. Bei einigen Versuchen mit calciumfreier KHB-Lösung wurde Dinatrium -äthylendiamin-tetraacetat ($\text{EDTA} \cdot 10^{-4}$ M, Fa. Merck, Darmstadt) der Perfusionslösung zugesetzt. Das hämoglobinfreie, salinische Medium wurde in zwei 2 l-Rundkolben in einem auf 38 Grad Celsius erwärmten Wasserbad den physiologischen Bedingungen ange-

paßt. Die Begasung erfolgte auch hier mit dem Carbogengemisch (95 Vol.% O_2 , 5 Vol.% CO_2). Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug ebenfalls 0,5-0,8 ml/min/g Feuchtgewicht.

3. Versuche in vivo

Die Tiere blieben während des Versuches intubiert und atmeten spontan mit Sauerstoff (4 l/min) angereicherte Raumluft. Der arterielle Druck und der Sauerstoffpartialdruck wurden während der 3-4 stündigen Versuchsdauer konstant gehalten.

Nach Unterbindung und Durchtrennung des Pylorus, des Choledochus und des accessorischen Pankreasganges wurde in den Ductus pancreaticus major eine PVC-Sonde eingebunden, über welche der Pankreassaft in Reagenzglasern aufgefangen wurde. Die Gabe der verschiedenen Sekretagoga erfolgte über einen vor dem rechten Vorhof in der Vena cava liegenden Katheter.

4. Untersuchungsmaterial

Die für die Stimulierung des Pankreasgewebes gewünschten Sekretagoga wurden am isolierten Organ über die Arteria lienalis und Arteria mesenterica superior als Bolusin-

jektion bzw. Dauerinfusion über ein Infusionsgerät (Unita I, Fa. Braun, Melsungen) zugeführt. Bei den in vivo Versuchen erfolgte die Gabe der Substanzen über den vor dem rechten Vorhof liegenden Cavakatheter. Das aus dem Ductus pancreaticus major gewonnene Sekret wurde in kleinen 10 ml-Meßzylindern mit 0,1 ml-Skaleneinteilung aufgefangen. Die anfangs minütlich, später 5-minütig abgenommenen Fraktionen lagerten während des Versuches in verschlossenen Kunststoffröhrchen auf Eis. In bestimmten Zeitabständen wurden bei verschiedenen Versuchen 80 - 200 mg schwere Pankreasgewebeproben mit einer anatomischen Pinzette und einer Präparierschere entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei -195,8 Grad Celsius eingefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 Grad Celsius in einer Tiefkühltruhe gelagert.

5. Verwendete Sekretagoga

Die Stimulierungen des Organs führten wir mit biologisch reinem Sekretin vom Schwein (GIH-Unit, Karolinska Institut, Stockholm) bzw. synthetischem Sekretin (Prof. Wunsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, München), biologisch reinem Cholecystokinin/Pankreozymin (CCK) vom Schwein (GIH Unit, Karolinska Institut, Stockholm), Caerulein (Soc. Farmaceutici, Milano) und Acetylcholinchlorid (Ach) (Fa. Merck, Darmstadt) durch.

6. Bestimmungsmethoden

Anhand verschiedener Untersuchungen (32, 42, 55, 63) konnte gezeigt werden, daß das Sekretionsverhalten einzelner Pankreasenzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Amylase, Lipase) der Ausscheidung des Gesamtproteins entspricht. Da sich das Gesamtprotein fast ausschließlich aus Enzymproteinen zusammensetzt, wurde die Enzymsekretion durch Bestimmung des Gesamtproteins im Sekret über die Biuret-Reaktion nach LOWRY et.al. (42) ermittelt. Für die Bestimmung des cAMP-Gehaltes wurden 80-200 mg schwere Gewebeproben entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Vor der Homogenisierung der Gewebefragmente in 4 ml 1 N Perchlorsäure bei 0 Grad Celsius im Waring-Blendor bei 1500 Umdrehungen pro Minute mußten für die Bestimmung der Ausbeute etwa 5000 cpm ^3H -cAMP (20 Ci/mmol, Fa. Amersham, England) zugesetzt werden. Für die Ermittlung des Proteingehaltes nach LOWRY (42) wurden 3x20 μl Homogenat entnommen und bei -20 Grad Celsius bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Das restliche Homogenat wurde 30 Minuten bei etwa 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand auf, mit 1 N Perchlorsäure präparierte, Aluminiumoxyd-Säulen aufgetragen. Anschließend erfolgte mit 4 ml 0,2 M Ammoniumformiat (pH 6) die gleichzeitige Elution von cAMP und cGMP. Über einen zweiten Säulenlauf mit Dowex 1x2 (200-400 mesh) und 2 N bzw. 4 N Ameisensäure wurden die beiden Nukleotide getrennt und die gewonnenen Fraktionen tiefgefroren, lyophilisiert und vor der Weiterverarbeitung in

500 µl Aqua bidest gelöst. Die Ausbeute an ^3H -cAMP betrug 80-90%. Der cAMP-Gehalt wurde über die kompetitive Proteinbindung von cAMP mit ^3H -cAMP im Radioassay nach G.GILMAN (27) bestimmt. Die Herstellung der cAMP-bindenden Protein-kinase erfolgte nach der von TRABER (62) modifizierten Methode nach MIYAMOTO (44). Mit gereinigter Phosphodi-esterase (Boehringer, Mannheim) wurde nach dem von FRANDSEN et. al. (22) ermittelten Verfahren die Richtigkeit des Nachweises von cAMP überprüft.

Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen der Probenkonzentration an cAMP und dem Feuchtgewicht bzw. dem Proteingehalt der untersuchten Gewebefragmente. Die über eine Eichkurve bestimmte cAMP-Konzentration einer Teilmenge wurde auf die Gesamtmenge des Lyophilisates umgerechnet, je nach Ausbeute korrigiert und auf den Proteingehalt bzw. das Feuchtgewicht der Gewebeentnahme bezogen. Bei gleichzeitiger Entnahme an unterschiedlichen Organstellen fand sich eine Schwankungsbreite der cAMP-Konzentration von 19%. Der basale cAMP-Spiegel blieb sowohl bei Durchströmung mit Blut als auch mit Krebs-Henseleit-Lösung über mehrere Stunden annähernd konstant (Abb.3).

Die Untersuchung des gewonnenen Pankreassekretes erfolgte anhand von 0,2 bzw 0,5 ml Saft, der mit der gleichen Menge 2 N Perchlorsäure bei 0 Grad Celsius versetzt und wie die Gewebeproben bis zur endgültigen Verarbeitung bei -80 Grad Celsius gelagert wurde. Die Saftproben wurden mit der glei-

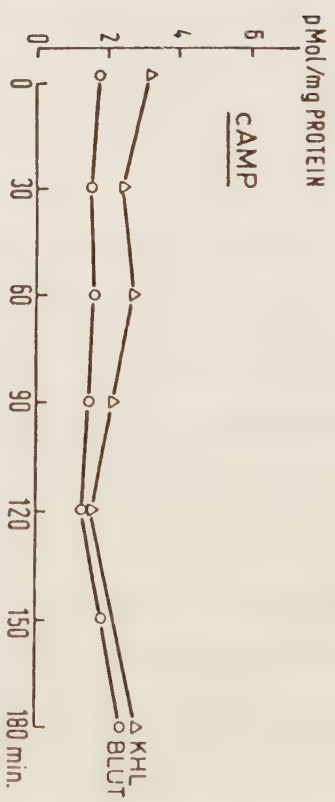


Abb. 3: Basaler Gewebespiegel von cAMP (pMol/mg Protein) bei rezirkulierender Perfusion des isolierten Pankreas mit autologem Blut bzw. mit Krebs-Henseleit-Lösung (KHL) bei offener Durchströmung.

chen Tracer-Aktivität von ^3H -cAMP und ^3H -cGMP versetzt, auf Aluminiumoxid-Säulen aufgetragen und entsprechend weiterverarbeitet.

Alle Meßwerte von Gewebeproben die zum gleichen Zeitpunkt unter analogen Versuchsbedingungen nach Stimulationsbeginn entnommen worden waren, wurden für die statistische Beurteilung von den Änderungen der cAMP-Konzentration gemittelt und zueinander in zeitliche Beziehung gesetzt.

ERGEBNISSE

1. Das zelluläre cAMP-Verhalten nach Sekretینگabe

In den folgenden Experimenten wurde der zeitliche Ablauf zellulärer Änderung des cAMP-Spiegels nach Sekretینگabe in vivo und am isoliert perfundierten Organ in vitro untersucht. Der basale cAMP-Spiegel blieb am nicht stimulierten Pankreas in vivo wie auch in vitro während der 3-stündigen Versuchsdauer annähernd konstant (Abb. 3). Auch unterschieden sich die Ausgangswerte von cAMP nach Organisolierung und Anpassung an konstante Versuchsbedingungen von den basalen in vivo gemessenen Werten nicht wesentlich (Tab.) Die Injektion eines Sekretinbolus führte in vivo bereits nach 30 Sekunden zu einem deutlichen Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration um 125 ± 39 SD% (n=8). Das Maximum wurde etwa nach 2-3 Minuten mit 300-350 % des Ausgangsspiegels erreicht (Tab.) und fiel in der Regel innerhalb von 5 Minuten wieder auf den Basalwert ab (Abb. 4, 5, 6). Bei den in vivo Versuchen war eine erneute, im Vergleich zum ersten Anstieg protrahiert verlaufende Zunahme des cAMP-Spiegels, die den Sekretionsvorgang um 60-120 Minuten überdauerte und das erste Maximum erreichte, zu erkennen.

In Abb. 5 wurde das zelluläre Konzentrationsverhalten von cAMP nach Sekretینگabe bei in vivo Versuchen mit der Kinetik der Saftsekretion bei minütlicher Fraktionierung an 4 Versuchen stellvertretend für insgesamt 8 Experimente auf-

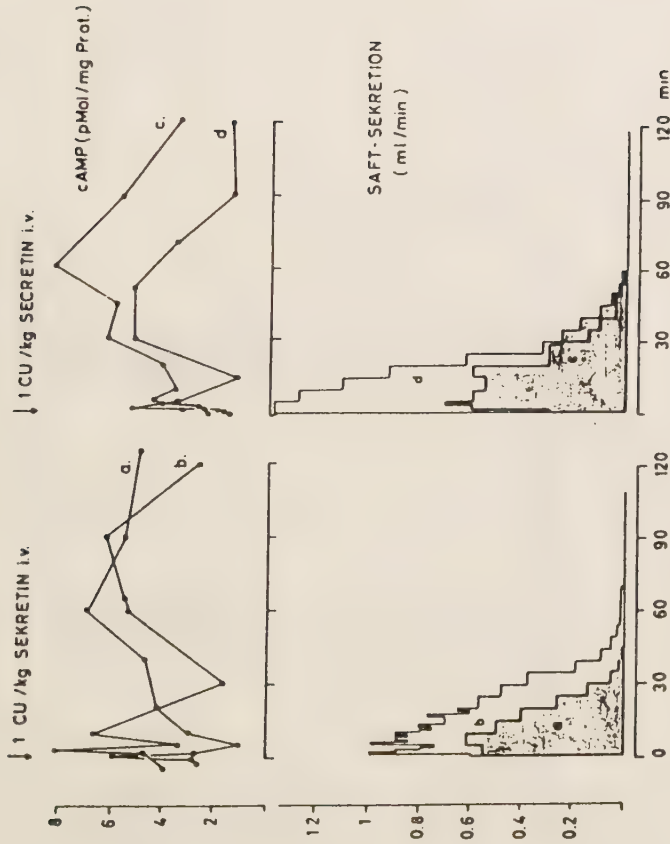


Abb. 4: Vergleich des zellulären cAMP-Verhaltens in vivo mit dem Sekretionsverlauf nach intravenöser Injektion von Sekretin. (4 repräsentative Beispiele aus 8 Experimenten).

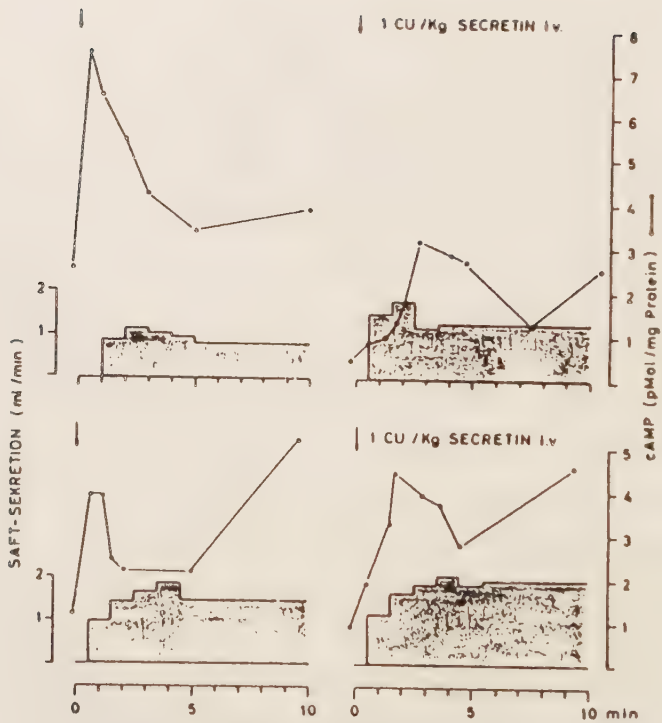


Abb. 5: Gegenüberstellung des Konzentrationsverhaltens von cAMP und des Sekretionsverlaufs nach Sn-Stimulierung in vivo bei minütlicher Fraktionierung des Saftflusses.

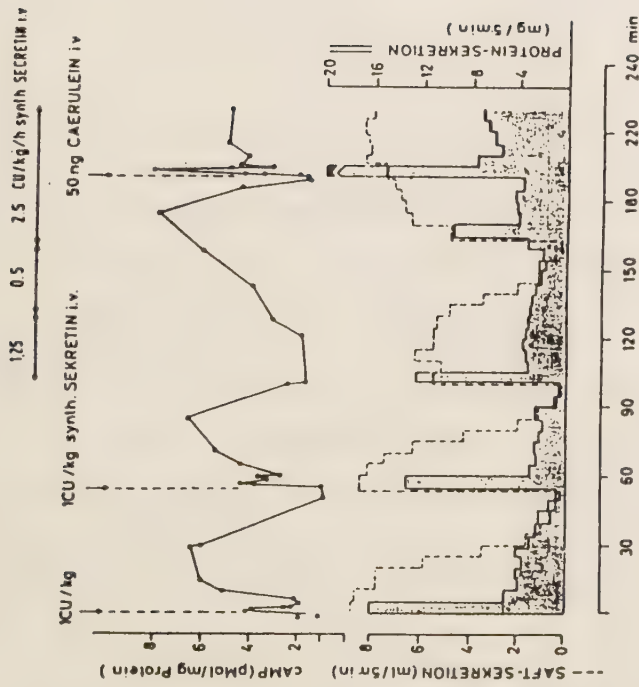


Abb. 6: Vergleich des zellulären cAMP-Verhaltens in vivo mit der Saftsekretion (gestrichelte Linie) nach Injektion von synthetischem Sekretin als Bolus bzw. während stufenweiser Änderung einer Sekretininfusion.
(2 identische Experimente)

gezeigt und verglichen. Bis zum Beginn der Saftsekretion verging eine mittlere Latenzzeit von 48,6 Sekunden, wobei in 6 von 8 Fällen der Anstieg der cAMP-Konzentration dem Sekretionsbeginn um etwa 15 Sekunden vorausging. In den anderen beiden Versuchen fielen diese Reaktionen zeitlich zusammen. Entsprechend dem Saftfluß erreichte der cAMP-Spiegel nach 2-3 Minuten sein Maximum, fiel dann jedoch im Gegensatz zur Sekretionsrate innerhalb von 5 Minuten annähernd auf das Ausgangsniveau zurück.

Aus 17 Experimenten am isolierten Pankreas bei offener Durchströmung mit Krebs-Henseleit-Lösung bzw. bei rezirkulierender Perfusion mit autologem Blut wurden 6 repräsentative Beispiele ausgewählt und in Abb. 7 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die zelluläre cAMP-Konzentration nach 2-5 Minuten ihr Maximum erreichte und dann annähernd konkordant zum Sekretionsverlauf in der Regel innerhalb von 30 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau abfiel. Im Vergleich zu den in vivo Experimenten zeigte sich hier eine langsamere Abnahme der maximalen cAMP-Konzentration. Auch kam es am isolierten Organ zu keinem zweiten Nukleotidanstieg (Abb. 7).

Weder bei unterschiedlicher hydrokinetischer Stimulierung an verschiedenen Organen (Abb. 7), noch bei stufenweiser Steigerung der Sekretinkonzentration durch Bolusinjektion (Abb. 8) oder kontinuierliche Infusion war eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der verabreichten Sekretinmenge und

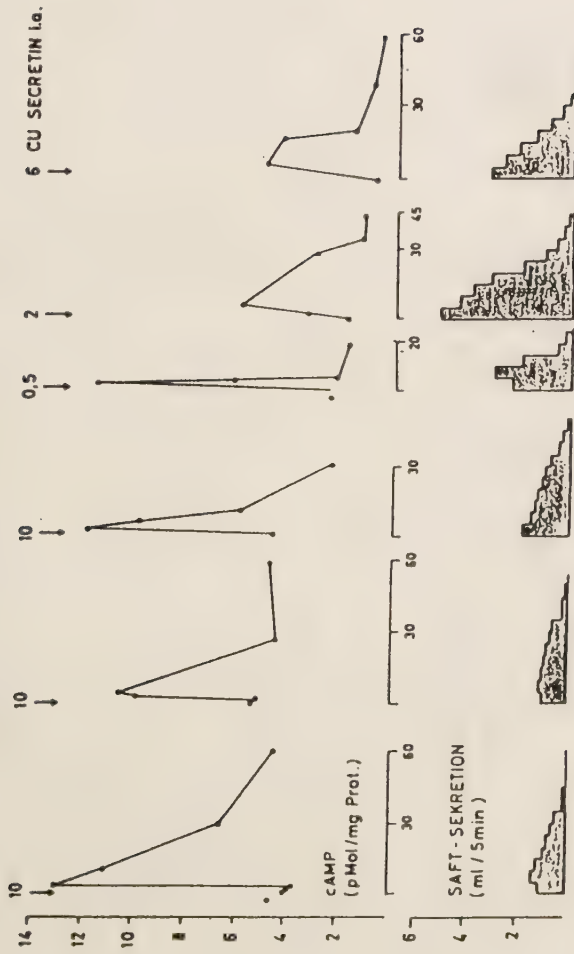


Abb. 7: 6 repräsentative Beispiele für das zelluläre cAMP-Verhalten nach intraarterieller Injektion von Sekretin a) bei offener Perfusion mit KHB-Lösung (erste 3 Beispiele), b) bei rezirkulierender Durchströmung mit autologem Blut (Beispiele 4 bis 6).

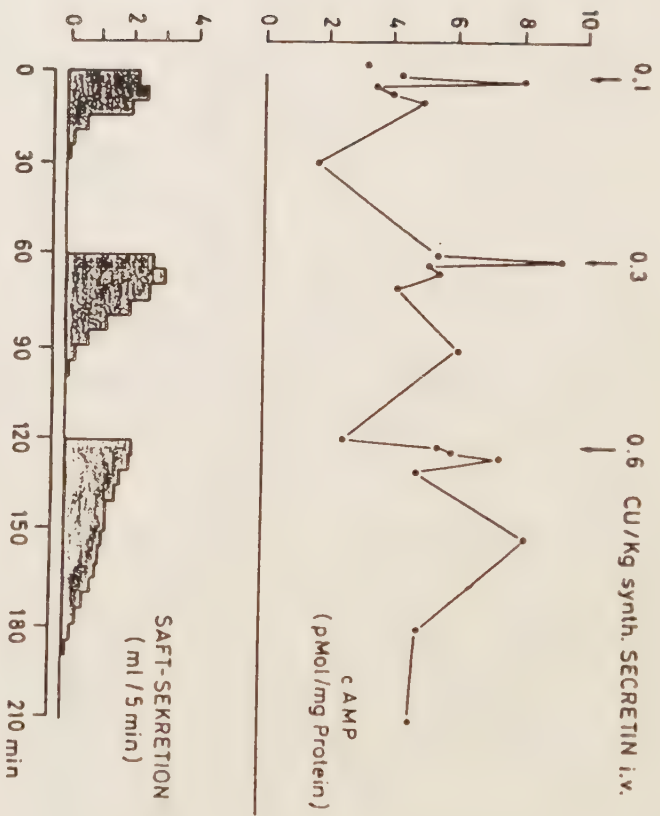


Abb. 8: cAMP-Verhalten bei Erhöhung der verabreichten Dosis von synthetischem Sekretin in vivo. Dosis-Wirkungsbeziehung der Saftsekretion. (Repräsentativ für 4 Experimente)

dem maximalen zellulären cAMP-Spiegel, trotz dosisbezogener Saftsekretion, zu beobachten.

Bei stufenweiser Steigerung der Infusionsrate von Sekretin zeigte sich ein verzögerter Anstieg von cAMP, der weder mit der Sekretinkonzentration noch mit der Sekretionsrate korrelierte. Trotz maximaler Stimulierung fiel die cAMP-Konzentration wieder auf den Ausgangswert ab (Abb. 6). Bei jeder Steigerung der Saftsekretion kam es zu einem kurzzeitigen Auswascheffekt von Enzymen. Die Proteinsekretion wies jedoch unabhängig davon weder nach Einzelreizen noch bei kontinuierlicher Stimulierung mit wechselnder Sekretinkonzentration eine signifikante Änderung bzw. Abhängigkeit von der Sekretionsrate auf.

2. Das zelluläre cAMP-Verhalten nach ekbolischen Sekretagoga

Gibt man bei kontinuierlicher Sekretininfusion zur Gewährleistung eines ausreichenden Saftflusses Acetylcholin, Cholecystokinin oder Caerulein als Bolusinjektion, so kommt es in vivo wie auch in vitro zu einem deutlichen Anstieg des cAMP-Spiegels. Die cAMP-Werte vor der Stimulierung mit ekbolischen Sekretagoga liegen bei kontinuierlicher Sekretininfusion im Durchschnitt nicht wesentlich über der basalen cAMP-Konzentration (Tab.). So wie Sekretin führen auch CCK, Caerulein und Ach zu einem schnellen Anstieg des cAMP-Spiegels.

Tab.: cAMP-Spiegel im Pankreasgewebe (pMol/mg Protein, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n = ())

	in vivo	isoliertes Pankreas	
		rezirkulierende Perfusion (Blut)	offene Perfusion (KHB)
basal	2.32 $\pm$ 0.32 (17)	2.92 $\pm$ 0.34 (15)	3.02 $\pm$ 0.44 (14)
Sekretin-Injektion	1 CU/kg i.v. (14)	1 CU i.a. (9)	10 CU i.a. (6)
nach Sn	6.98 $\pm$ 0.97	9.63 $\pm$ 1.22	10.51 $\pm$ 1.43
CCK-Injektion bei Sn-Infusion	1 IDU/kg i.v. (18)	1 IDU i.a. (6)	10 IDU i.a. (8)
vor CCK	4.23 $\pm$ 0.63	4.16 $\pm$ 0.99	4.1 $\pm$ 0.51
nach CCK	23.51 $\pm$ 2.21	12.06 $\pm$ 1.06	11.9 $\pm$ 1.22
Caerulein-Injektion bei Sn-Infusion	50 ng i.v. (8)	50 ng i.a. (8)	
vor	3.34 $\pm$ 0.55	4.13 $\pm$ 0.73	
nach	8.4 $\pm$ 1.12	9.3 $\pm$ 1.2	
Acetylcholin-Injekt. bei Sn-Infusion	1 mg/kg i.v. (8)	1 mg i.a. (8)	1 mg i.a. (4)
vor	4.37 $\pm$ 0.71	3.72 $\pm$ 0.61	4.15 $\pm$ 0.7
nach	12.4 $\pm$ 1.9	11.84 $\pm$ 1.77	10.9 $\pm$ 1.41

Basale und maximale cAMP-Spiegel unter verschiedenen Versuchs- und Stimulationsbedingungen. Die basalen cAMP-Werte wurden vor Stimulation in vivo und nach 30-minütiger Vorperfusion zur Einstellung konstanter Versuchsbedingungen am isolierten, mit Blut bzw. KHB durchströmten Organ entnommen (n= Zahl der Experimente). Die cAMP-Spiegel nach Stimulation mit Sn, CCK, Ach und Caerulein entsprechen den Mittelwerten der jeweiligen cAMP-Maxima 1-5 Minuten nach Injektion aus n Experimenten. Die ekbo- lischen Sekretagoga wurden nach 1-stündiger Infusion von 0,5 - 1 CU/kg/h in vivo, 10 - 15 CU/h bei rezirkulierender und von 20 - 30 CU/h bei offener Durchströmung mit KHB zum Zeitpunkt annähernd konstanter cAMP-Spiegel verabreicht.

An 4 repräsentativen Beispielen aus 10 Versuchen (Abb. 9) soll das zelluläre Verhalten von cyclo-Adenosin-3':5'-monophosphat nach Einzelstimulationen mit CCK, Ach und Caerulein in vivo gezeigt werden. Bei den unterschiedlichen ekbolischen Sekretagoga zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Kinetik der cytoplasmatischen Konzentrationsänderung von cAMP. Das Verhalten unterschied sich auch nicht gegenüber dem nach Gabe von Sekretin. 1 - 3 Minuten nach der Stimulation erreichte die cAMP-Konzentration ihr Maximum, fiel jedoch innerhalb von 5 Minuten auf den Ausgangswert ab und zeigte nach 30 - 40 Minuten einen zweiten protrahierten Anstieg mit einem zweiten Gipfel. Der erste Anstieg von cAMP verlief koinzident mit dem Maximum der Enzymsekretion. Noch während oder unmittelbar nach dem Abklingen der Sekretionsphase begann der Wiederanstieg, welcher letztere um 30 - 40 Minuten überdauerte.

Durch eine kontinuierliche Stimulation des Hundepankreas mit Sekretin erreichte man einen ausreichenden Saftfluß, der den Abtransport der Enzymproteine aus dem Gangsystem gewährleistete und somit einen Vergleich des Verhaltens von zellulärem cAMP nach ekbolischem Reiz mit der Enzymfreisetzung erst möglich machte.

Wurde bei konstanter Saftsekretion das Pankreassekret minutlich fraktioniert, so zeigte sich nach intravenöser Gabe von CCK oder Caerulein in vivo bereits in der ersten Minute eine signifikante Zunahme der Enzymsekretion. In der zwei-

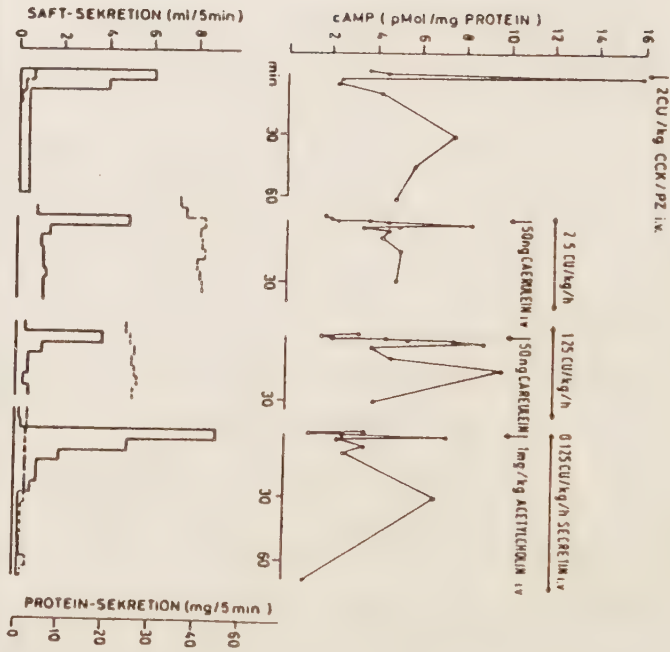


Abb. 9: Zelluläres cAMP-Verhalten in vivo nach verschiedenen ekfolischen Sekretagoga. CCK wurde im dargestellten Fall ohne gleichzeitige Gabe von Sn als Bolus injiziert. Caerulein oder Acetylcholin wurden einer kontinuierlichen Sn-Stimulierung superponiert. (4 repräsentative Beispiele aus 10 vergleichbaren Experimenten)

ten Fraktion erreichte sie ihr Maximum um danach in den folgenden 3 - 5 Minuten wieder abzufallen (Abb 10). Bei zwei von den 4 dargestellten Versuchen kam es nach 17 bzw. 35 Sekunden zu einem deutlichen Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration. Die anderen beiden Fälle zeigten jedoch erst nach 60 bzw. 75 Sekunden diese Reaktion. Insgesamt 13 von 25 ekbolischen sowohl in vivo als auch am isolierten Organ durchgeführten Einzelreizen mit CCK, Ach bzw. Caerulein bei 15 Experimenten zeigten diesen signifikanten Anstieg in der ersten Minute um 226 ± 65 SD%. In den restlichen 12 Fällen zeigte sich die Zunahme der cAMP-Konzentration erst nach 90 - 120 Sekunden. Das Maximum lag nach 2 - 5 Minuten um 336 ± 75 SD% ($n=53$) über der Ausgangskonzentration.

Durch die in den Pankreasgang eingebundene Sonde ergab sich ein Totraum von ca 0,4 ml, was bei einer minütlichen Sekretionsrate von etwa 0,8 ml (Abb. 10) bedeutet, daß die Zunahme der Enzymsekretion bei minütlicher Fraktionierung erst 30 Sekunden nach dem eigentlichen Anstieg erfaßt wurde. So müssen die in Abb. 10 dargelegten Proteinfraktionen um 30 Sekunden zum Stimulationszeitpunkt hin verschoben werden. Die maximale Enzymsekretion setzte somit 30 Sekunden nach dem entsprechenden Reiz ein. Der cAMP-Anstieg ging nach Gabe von ekbolischen Sekretagoga der Enzymsekretion somit nicht voraus, sondern fiel mit dieser zusammen. Erst 30 - 60 Sekunden nach dem Sekretionsmaximum erreichte das cAMP seinen höchsten Wert. Abb. 11 zeigt den Verlauf der

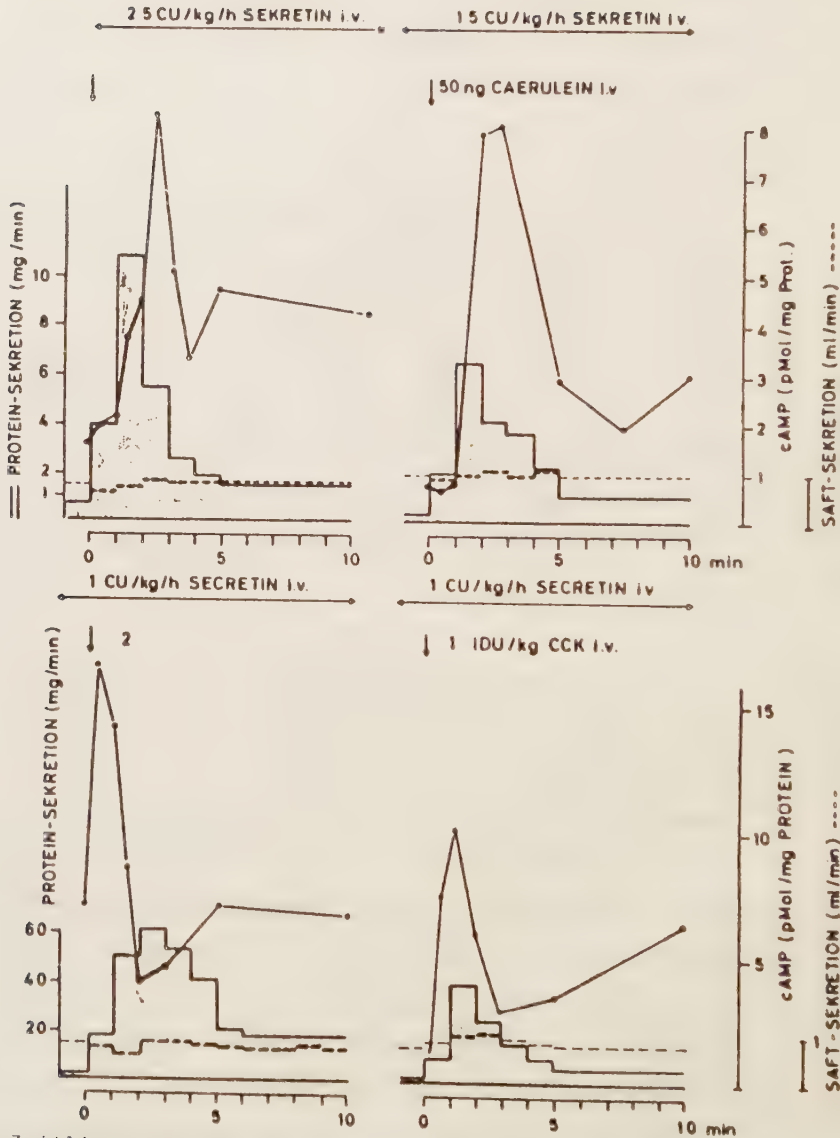


Abb. 10: Zeitliche Gegenüberstellung des zellulären cAMP-Verhaltens und der Enzymsekretion nach Caerulein bzw. CCK in vivo bei minutlicher Fraktionierung des Saftflusses und Sekretin-Basisinfusion. (4 repräsentative Experimente)

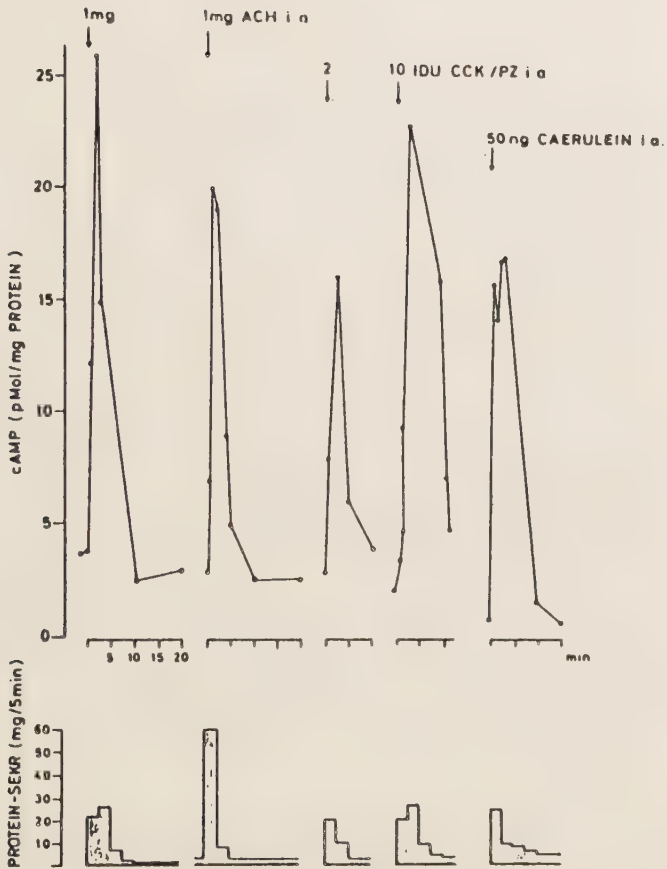


Abb. 11: Ablauf der zellulären cAMP-Veränderungen nach verschiedenen ekbolischen Einzelreizen (Ach, CCK, Caerulein) am rezirkulierend perfundierten Pankreas. Gegenüberstellung mit dem Ablauf der Enzymsekretion.

zellulären cAMP-Konzentrationsänderung am isoliert perfundierten Organ nach Stimulation mit verschiedenen ekbolischen Sekretagoga. Das Zusammenfallen vom Protein-Sekretions- und cAMP-Maximum ist dabei deutlich zu erkennen. Am isolierten Pankreas fiel die cAMP-Konzentration, im Gegensatz zu dem Verhalten in vivo, erst nach etwa 10 Minuten auf den Ausgangswert ab, was annähernd dem Verlauf der Enzymsekretion entspricht. Zu einem Wiederanstieg des cAMP-Gehaltes kam es am isolierten Organ nicht.

Zwei identisch durchgeführte Versuche zeigten eine dosisabhängige Zunahme der zellulären cAMP-Konzentration bei 5-facher Steigerung der CCK-Dosis (Abb. 12). Es kam zu einer entsprechenden Zunahme der Enzymsekretion. Im Gegensatz zu in vivo Versuchen wurde am isolierten Organ dadurch der Saftfluß nicht beeinflusst. Die 10-fache Erhöhung der Schwellendosis (5ng) von Caerulein führte zu keiner weiteren Steigerung der cAMP-Werte, obwohl die Enzymsekretion zunahm.

Bei einer Reihe aufeinanderfolgender ekbolischer Reize mit zunehmender Größe kam es in fast allen Experimenten zu einer Abnahme der zellulären cAMP-Antwort, obwohl die Enzymsekretion dosisabhängig zunahm. Weder in vivo noch in vitro gelang es reproduzierbare Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen mehreren aufeinanderfolgenden Konzentrationsänderungen ekbolischer Sekretagoga und dem zellulären cAMP-Verhalten nachzuweisen. Auch bei Reizen mit Sekretin zeigte

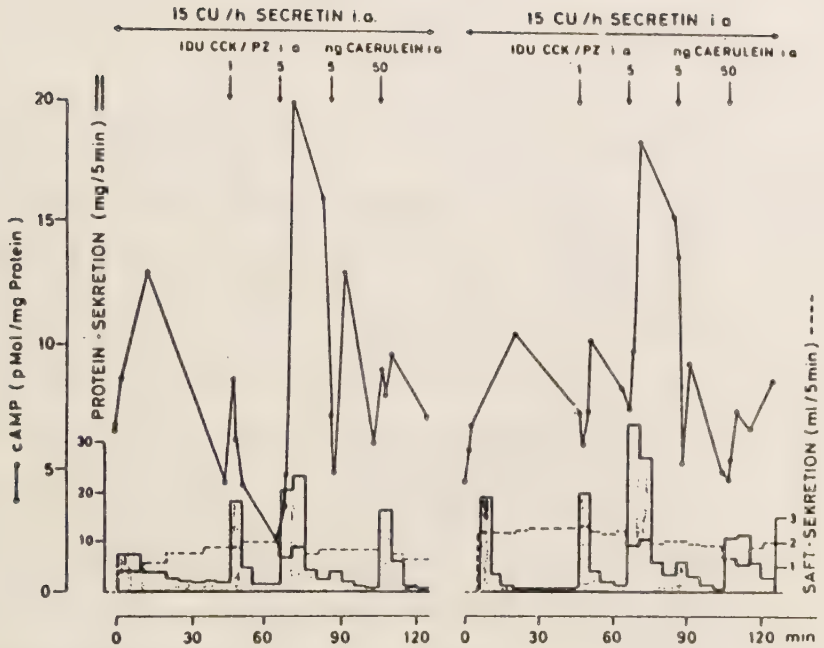


Abb. 12: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen zellulärer cAMP-Konzentration und CCK bzw. Caerulein bei rezirkulierender Perfusion mit 200 ml Blut bei Sekretin-Basisinfusion. (2 repräsentative Beispiele)

sich keine strenge Abhängigkeit. Große Konzentrationsunterschiede von Sekretin oder ekbolischen Sekretagoga führten jedoch zu deutlichen cAMP-Veränderungen in den Zellen, insbesondere wenn ein längeres Zeitintervall zwischen dem vorangegangenen Reiz lag.

Auch die stufenweise Steigerung einer kontinuierlichen CCK-Infusion zeigte in vivo eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich der Enzymsekretion und einen potenzierenden Effekt auf die Saftproduktion. Die zelluläre cAMP-Konzentration nahm jedoch stetig ab (Abb. 13). Die höchsten Werte fanden sich bei 3 identischen Experimenten jeweils zu Beginn bei der niedrigsten CCK-Konzentration. Dabei kam es bei dieser Konzentration nur in einem Fall zu einer Steigerung der Enzymsekretion. Der anfängliche cAMP-Anstieg nahm jedoch trotz kontinuierlicher Stimulierung mit CCK wieder ab. Jede weitere Erhöhung der CCK-Konzentration führte zu einem erneuten kurzzeitigen Anstieg des cAMP-Spiegels. Die einzelnen cAMP-Maxima nahmen dabei wertmäßig ab. Ein am Ende des Versuches verabreichter CCK-Bolus führte regelmäßig zu einem verstärkten cAMP-Anstieg. In keinem Fall wurde dabei die Höhe des ersten Maximums, bei einem CCK-Reiz mit der Schwellendosis, erreicht. Die Proteinsekretion wurde im Vergleich dazu um das 10-fache angehoben.

Dieses Verhalten läßt auf eine gewisse Abhängigkeit des zellulären cAMP-Spiegels von der CCK-Konzentration schlies-

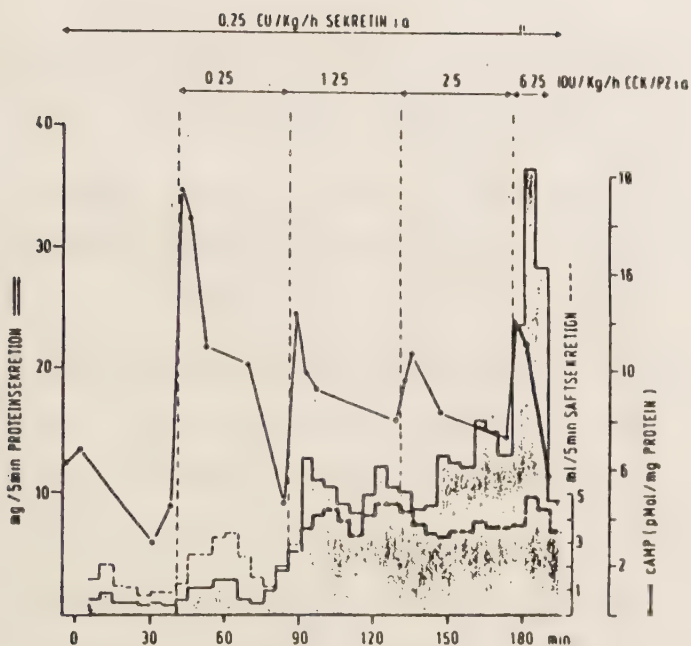


Abb. 13: Zelluläres Konzentrationsverhalten von cAMP bei stufenweiser Steigerung einer kontinuierlichen CCK-Stimulierung in vivo bei Sekretin-Basisinfusion. Vergleich mit dem exkretorischen Sekretionsverhalten.

sen. Eine strenge Dosis-Wirkungsbeziehung bestand jedoch im Vergleich zur sekretorischen Antwort nicht.

3. Das zelluläre Verhalten von cAMP nach ekbolischer Stimulierung im calciumfreien Medium

Durchströmt man bei kontinuierlicher Stimulation mit Sekretin und CCK das isolierte Organ periodisch mit calciumhaltiger (2,5 mM) bzw. calciumfreier (+10 M EDTA) KHB-Lösung, so läßt sich keine wesentliche Differenz der cAMP-Spiegel unter den beiden Versuchsbedingungen feststellen (Abb. 14). Die ekbolische Wirkung einer kontinuierlichen Infusion oder Bolusinjektion von Ach bzw. CCK wird bei calciumfreier Perfusion fast vollständig aufgehoben. Trotzdem kam es, wie die Versuche in Abb. 15 zeigen, nach Ach-Injektion zu einem deutlichen Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration. Bei einer zum Vergleich nachfolgenden calciumhaltigen Perfusionsperiode war der Ablauf der zellulären Veränderungen in Bezug auf das cAMP-Verhalten gegenüber dem calciumfreien Medium unverändert. Der Höchstwert an cAMP nach der 1. Ach-Injektion lag in allen 3 Experimenten über den Maxima der anschließenden calciumfreien bzw. calciumhaltigen Versuchsperioden.

Auch bei längerer Durchströmung des Organs mit calciumfreier Lösung und Zusatz von EDTA (10 M) über 80 Minuten kam es nach Injektion von CCK zu einem deutlichen Anstieg von

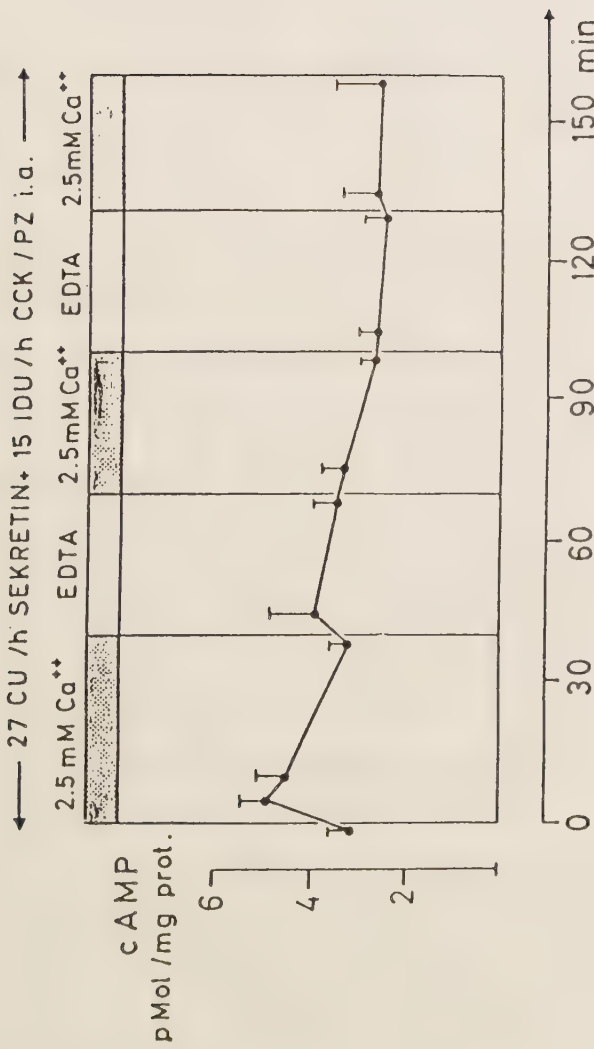


Abb. 14: cAMP-Spiegel unter kontinuierlicher Stimulierung mit Sn und CCK bei wechselweiser Perfusion mit calciumfreier (+EDTA 10^{-4} M) und calciumhaltiger KHB. (n = 6)

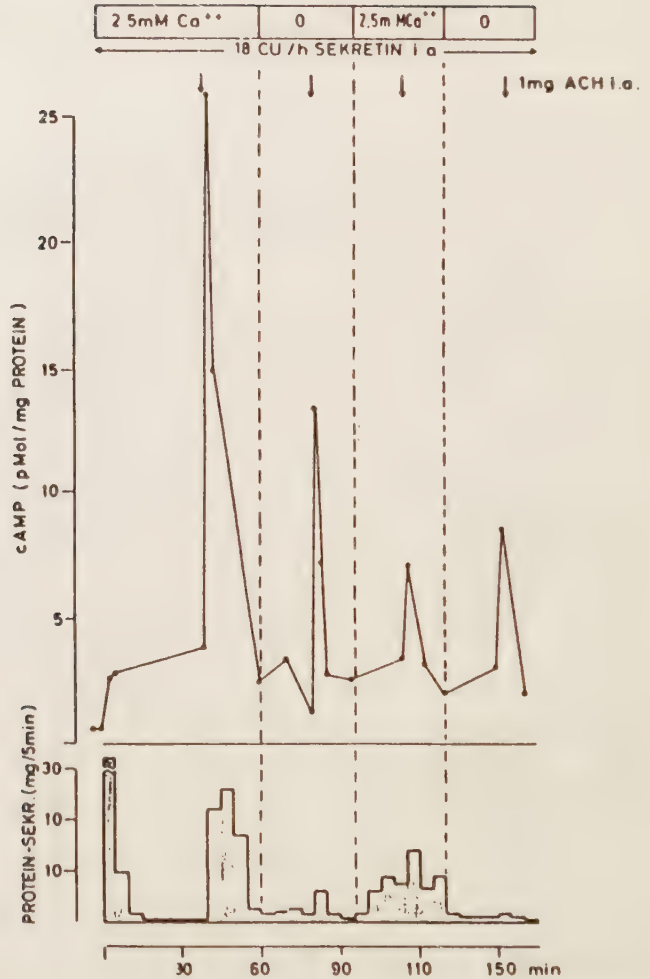


Abb. 15: cAMP-Verhalten nach intraarterieller Ach-Injektion bei offener Perfusion mit calciumhaltiger bzw. calciumfreier KHB-Lösung bei Sekretin-Basisinfusion. Dem calciumfreien Perfusat wurde EDTA (10^{-4} M) zugesetzt.
(Repräsentativ für 3 Experimente)

cAMP, ohne daß die Proteinsekretion zunahm (Abb. 16). Eine im Anschluß an eine verlängerte calciumfreie Perfusionsperiode durchgeführte erneute Stimulation mit CCK im calciumhaltigen Medium führte weder zu einem wesentlichen Anstieg der Proteinsekretion noch zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels. Das Organ wurde wahrscheinlich durch die langdauernde Perfusion mit calciumfreier KHB-Lösung irreversibel geschädigt.

Nach einer kurzzeitigen Durchströmungsperiode mit calciumfreier Lösung (Abb. 15) führte allein schon die erneute Perfusion mit calciumhaltiger KHB-Lösung zu einer Steigerung der Proteinsekretion, ohne daß sich der cAMP-Spiegel änderte. Die Proteinsekretion kann auch durch Gabe von Ach angehoben werden.

Sekretin führte bei der Perfusion mit calciumfreier Lösung zu einem nahezu unveränderten Anstieg von zellulärem cAMP. Die hydrokinetische Wirkung von Sekretin wurde dabei im Gegensatz zur ekbolischen Wirkung von CCK und Ach durch den extrazellulären Calciumentzug weniger beeinflusst (61).

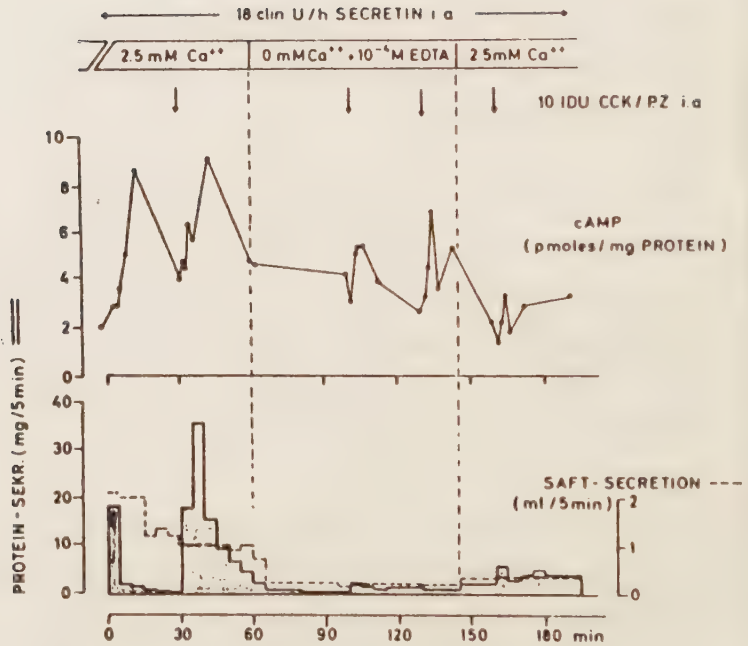


Abb. 16: cAMP-Verhalten nach CCK bei calciumhaltiger bzw. calciumfreier Perfusion (+EDTA 10⁻⁴ M) bei kontinuierlicher Sekretininfusion.
(Repräsentativ für 3 Experimente)

DISKUSSION

Pankreasgewebe ist ein heterogenes Gewebe, das sich zu 90% aus Azinuszellen, zu 4% aus Gang- und zentroazinären Zellen, zu 2-4% aus Inselzellen und zu 2-4% aus Fett-, Bindegewebs- und anderen Zellen zusammensetzt (5, 9, 34). Die Konzentration von cAMP ist in der Inselzelle etwa 50-100 mal kleiner als im exokrinen Gewebe (45). So kann man eine Zunahme des cAMP-Gehaltes durch Insulinfreisetzung nach Sn, CCK oder Ach (10) in Anbetracht des geringen Gewebeanteils vernachlässigen.

FÖLSCH und CREUTZFELDT beschrieben 1976/77, daß CCK, Caerulein und Ach beim Hundepankreas an den azinären und Sn an den ductulären Zellen angreifen (20, 21). Nach dieser Erkenntnis spiegelt die cAMP-Konzentration einer Gewebeprobe nach Stimulierung mit ekbolischen Sekretagoga vor allem die azinären Veränderungen wieder. So wäre nach Sekretengabe die Konzentrationsänderung von cAMP auf den ductulären Anteil mit 4% zu beziehen, die tatsächliche cAMP-Konzentration läge demnach etwa 25 mal höher. Das basale und durch Sn stimulierte cAMP lag beim Gangmodell des Rattenpankreas (20, 21) ca. 10 mal höher als an Pankreasfragmenten mit erhaltenen Azinuszellen. CCK zeigte hierbei keine Wirkung auf das cAMP-Verhalten der ductulären Zellen (20, 21).

Pankreasfragmente und isolierte Azinuszellen der Ratte und des Meerschweinchens (23, 26, 49, 51) zeigten nach Sekretin

sowohl eine signifikante Zunahme an cAMP als auch eine Steigerung der Enzymfreisetzung. Bei der Maus, dem Hund und der Katze (51) führte Sekretin im Pankreas nur zu einem cAMP-Anstieg ohne Steigerung der Enzymsekretion (25, 51). Die Membranpotentiale von Azinuszellen der Maus (14) wurden durch Sekretingabe nicht verändert. Im Vergleich zu isolierten Azinuszellen des Meerschweinchens (23) und der Ratte (15) zeigte Sekretin am Hundepankreas weder in vivo noch am isolierten Organ einen deutlichen ekbolischen Effekt (Abb. 6). Sekretin führte dabei lediglich zu einem anfänglichen Auswascheffekt der im Gangsystem gelagerten Enzyme. Die Sekretagoga CCK, Caerulein und Ach zogen am isoliert perfundierten Hundepankreas weder eine Steigerung der basalen noch der stimulierten Saftsekretion nach sich (Abb. 12, 16). Bei den in vivo Versuchen kam es durch Cholecystokinin zu einer Potenzierung der Sekretinwirkung, wie Abb. 13 an 3 repräsentativen Beispielen zeigt. Diese Reaktion fand sich jedoch nicht regelmäßig (Abb. 10). Die alleinige CCK-Injektion führte in vivo nur zu einem sehr geringen (Abb. 9 - erste Spalte) und am perfundierten Organ zu keinem Anstieg der Saftsekretion. Caerulein und Ach zeigten auch in vivo auf den basalen oder stimulierten Saftfluß keinen Einfluß. Sekretindosen von der Größenordnung, wie sie bei den verwendeten CCK-Konzentrationen als Verunreinigung des biologisch reinen GIH-CCK gefunden werden ($0,7 \text{ CU Sn} / 75 \text{ IDU CCK}$), hatten weder in vitro noch in vivo einen meßbaren hydrokinetischen Effekt zur Folge, noch beeinflussten sie die zellulären cAMP-Spiegel. Somit lassen sich die mit CCK

erzielten cAMP-Konzentrationsänderungen weder durch seine Einwirkung auf die ductulären Zellen noch durch die Verunreinigung mit Sekretin erklären. Bei der Stimulierung mit Caerulein bzw. Ach entfallen beide Möglichkeiten.

Das zelluläre Verhalten von cAMP nach Sekretingabe

Die basale cAMP-Konzentration zeigte in vivo ($\bar{x} = 3,64 \pm 1,1$ SD pMol/mg Protein, $n = 14$) und am isolierten Organ bei Perfusion mit autologem Blut ($\bar{x} = 3,7 \pm 1,3$ SD pMol/mg Protein, $n = 29$) sowie bei Durchströmung mit KHB-Lösung ($\bar{x} = 3,25 \pm 0,98$ SD pMol/mg Protein, $n = 22$) keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 3). Dasselbe gilt auch für die cAMP-Spiegel nach Gabe von vergleichbaren Sn-Konzentrationen.

Am isoliert perfundierten Organ und in vivo kam es nach Sekretingabe zu einem zeitgleichen Anstieg der cAMP-Konzentration innerhalb der ersten 30 Sekunden und zu einem Maximum nach 2 - 5 Minuten. Durchschnittlich vergingen $48,2 \pm 11,2$ SD Sek. bis zum Beginn der Saftsekretion. Bei den meisten Versuchen setzte der cAMP-Anstieg etwa 15 Sek. vor der Saftsekretion ein, in einigen Fällen fielen diese beiden Reaktionen zeitlich zusammen. Sekretions- und cAMP-Maximum zeigten immer eine zeitliche Übereinstimmung. Wie aus den Abb. 4, 5, 6 und 8 deutlich wird, fiel die cAMP-Konzentration in vivo trotz maximaler Sekretionsraten innerhalb der ersten 5 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau ab. Im Ge-

gensatz dazu verlief der Abfall am isoliert perfundierten Organ annähernd parallel zum Sekretionsverlauf (Abb. 7). Während bzw. nach Ablauf der Sekretionsphase kam es nur in vivo zu einem Wiederanstieg von cAMP über einen Zeitraum von 60 - 120 Minuten. CASE et al. beobachteten dies auch am Pankreas der Katze sowohl in vivo als auch in vitro (7).

Das cAMP-Verhalten nach ekbolischen Sekretagoga

Wie einige Versuche, in Abb. 11, 12 und 15 dargestellt, zeigten, führten CCK, Ach und Caerulein in vivo und am isoliert mit Blut und KHB perfundierten Organ in gleicher Weise nach 30 - 60 Sekunden zu einem deutlichen zellulären cAMP-Anstieg. Wenn auch der anfängliche Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration in einigen Experimenten der Enzymfreisetzung vorausging (Abb. 10), fiel doch bei einer in vivo und in vitro gemessenen vergleichbaren durchschnittlichen Latenz der Enzymsekretion von $41,5 \pm 5,4$ SD Sekunden nach einem ekbolischen Einzelreiz während kontinuierlicher Stimulation mit Sekretin dieser Anstieg im Durchschnitt zeitlich mit dem Sekretionsbeginn zusammen. In einzelnen Fällen stieg der cAMP-Wert erst 30 - 60 Sekunden nach Sekretionsbeginn an und erreichte nach 1 - 3 Minuten sein Maximum. Während es nach Sekretin zu einem raschen cAMP-Anstieg kam, erfolgte dieser nach Reiz mit ekbolischen Sekretagoga erst ca. 30 Sekunden später. Diese Verzögerung läßt auf komplexe zelluläre Ursachen schließen.

Da die ekbolischen Sekretagoga am Hundepankreas selbst keinen hydrokinetischen Effekt haben, muß ihnen zur Erfassung des Ablaufes der Enzymsekretion eine Dauerstimulation mit Sekretin zu Grunde gelegt werden. Wenn Sekretin, wie bei anderen Spezies (18, 23, 33, 51, 59), auch einen Einfluß auf die zelluläre Homeostase von cAMP an der Azinuszelle des Hundepankreas hat, käme es wie bei dem Meerschweinchen und der Ratte zu einer Konkurrenz unterschiedlicher Hormonrezeptoren an der katalytischen Einheit der Adenylcyclase (18, 33, 59). Für diesen Einfluß des Sekretins könnten die hohen cAMP-Gewebespiegel bei nur 4% duktulären Zellen sprechen (9). Es besteht jedoch keine additive Wirkung von Sn und ekbolischen Sekretagoga auf die Adenylcyclase. Das zusätzliche und vermutlich verzögert gebildete cAMP nach einem superponierten, ekbolischen Reiz trifft auf eine veränderte intrazelluläre Situation. Durch Sekretin kommt es zu einer Steigerung der Phosphodiesteraseaktivität und somit möglicherweise zu einer beschleunigten Hydrolyse des gebildeten cyclischen Adenosin-3':5'-monophosphats. Dieser Vorgang könnte bei einigen Spezies und Versuchsmodellen, bei denen Ach und CCK offensichtlich keine Wirkung auf das zelluläre cAMP haben, von Bedeutung sein (26, 31, 52). Sn und VIP erhöhen auch die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase und führen somit zu einer schnelleren Bindung von cAMP (61).

Nach Gabe von CCK, Ach und Caerulein stellte sich das Maximum der Enzymsekretion etwa nach 1 Minute ein. Die höchste

cAMP-Konzentration wurde durchschnittlich nach 1 - 3 Minuten, spätestens jedoch nach 5 Minuten erreicht. Die Abnahme der cytoplasmatischen cAMP-Spiegel verlief mit der Sekretion konkordant und war am isoliert perfundierten Organ gegenüber in vivo Versuchen deutlich langsamer (Abb. 11, 12). Nur in vivo kam es nach Stimulation mit ekbolischen Sekretagoga oder Sekretin zu einem zweiten cAMP-Anstieg (Abb. 9). Dieser überdauerte den exkretorischen Sekretionsprozeß um 30 - 60 Minuten.

Das Verhalten der zellulären cAMP-Veränderungen bei Versuchen in vivo und am isolierten Hundepankreas entsprach demjenigen nach Sekretingabe und stimmt weitgehend mit den Beobachtungen von CASE et.al. an der Katze überein (7). Dieses Verhalten steht jedoch im Gegensatz zu dem mangelnden Einfluß ekbolischer Sekretagoga auf isolierte Azinuszellen und inkubierte Pankreasfragmente der Ratte und des Meerschweinchens (1, 11, 12, 19, 22, 26, 29, 33, 41, 48, 52). Vergleichsweise kam es zwar in vivo, nicht aber am isolierten Hundepankreas trotz gleicher Versuchsbedingungen zu einem Wiederanstieg von cAMP nach Sn (Abb. 7) bzw. ekbolischen Sekretagoga (Abb. 11, 12, 15). Außerdem fiel der cytoplasmatische cAMP-Spiegel im Gegensatz zu den Beobachtungen an der Katze auch bei fortlaufender hydrokinetischer bzw. ekbolischer Stimulierung wieder auf den Ausgangswert ab, obwohl der jeweilige Sekretionsvorgang unverändert weitergeführt wurde (Abb. 6, 13).

Da CCK, Caerulein und Ach auch ohne begleitende hydrokinetische Stimulierung zu gleichen zellulären cAMP-Konzentrationsänderungen führen, kann die Wirkung der ekbolischen Sekretagoga auf das zelluläre cAMP-Verhalten nicht nur über eine Potenzierung der zellulären Sekretinwirkung gesehen werden. Zudem zeigen Ach und Caerulein auf den basalen und stimulierten Saftfluß keinen Einfluß. CCK steigert nur in vivo die durch Sekretengabe hervorgerufene Volumensekretion. Daraus läßt sich auf einen direkten Einfluß ekbolischer Sekretagoga auf den cytoplasmatischen cAMP-Spiegel im Zusammenhang mit dem durch sie induzierten Vorgang der Enzymfreisetzung (Exozytose der Enzymgranula) schließen.

Dissoziation zwischen zellulärem cAMP-Verhalten und exkretorischer Funktion

Im Gegensatz zur Saft- und Enzymsekretion zeigte sich in vivo und in vitro weder nach Sekretin (Abb. 6, 8) noch nach CCK, Ach oder Caerulein (Abb. 11, 12) eine strenge Dosis-Wirkungsbeziehung zum zellulären cAMP-Gehalt. Große Konzentrationsunterschiede hydrokinetischer und ekbolischer Sekretagoga führten jedoch zu deutlichen und wiederholbaren Steigerungen des zellulären cAMP-Gehaltes (7, 8). CASE et. al. (7) beschrieben ähnliche Befunde am Pankreas der Katze. KAPOOR et.al. (31) fanden an isolierten Azinuszellen eine Korrespondenz von zellulärem cGMP und der Amylasefreisetzung in Abhängigkeit von der Konzentration ekbolischer Sekretagoga.

Bereits eine partielle Besetzung der Rezeptoren durch Peptidhormone oder cholinerge Transmittersubstanzen führen nach ROBBERECHT et al. (53) zu einer maximalen sekretorischen Antwort. Jedoch erst nach weiterer Besetzung der Rezeptoren wird die höchste cAMP-Konzentration erreicht. Die sekretorische Antwort ist somit ein besserer Indikator für die effektive Konzentration der Reizsubstanz als das cytoplasmatische cAMP-Verhalten. Das als Metabolit bei rasch ablaufenden zellulären Reaktionen wirkende cAMP wird in einem dynamischen Gleichgewicht gehalten, was möglicherweise eine nicht streng verlaufende Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen cAMP und hydrokinetischen bzw. ekbolischen Sekretoga zur Folge hat.

Wie in Abb. 13 dargestellt, kam es trotz stufenweiser Steigerung der CCK-Konzentration mit konkordant verlaufender Zunahme der Enzymsekretion zu einer kontinuierlichen Abnahme der cAMP-Spiegel. Dies kann sowohl Folge gegenregulatorischer Mechanismen wie auch Ausdruck einer Aktivitätsabnahme der Adenylcyclase durch Hemmung bei erhöhter cytoplasmatischer Calciumkonzentration sein (4, 19, 52, 54). Bei den gegenregulatorischen Mechanismen kommt vor allem eine gesteigerte Aktivität der cAMP-abhängigen Phosphodiesterase in Betracht. Weiterhin kommt es zu einer Bindung von cAMP an die Proteinkinase und an Phosphorylasen und somit zu einer vermehrten Phosphorylierung von Proteinen (11, 39). Eine Abnahme der cytoplasmatischen Konzentration von cAMP ist auch über einen beschleunigten Metabolismus

bei vermehrter Enzymfreisetzung denkbar. Zudem beschrieben SINGER et.al. (56), DOMSCHKE et. al. (16, 17) und ROBBERECHT (52) eine Elimination von cAMP über den Pankreassaft und den venösen Abfluß.

Nur durch die Vielfalt an regulatorischen Einflüssen auf das cytoplasmatische cAMP wird die rasche Abnahme der hohen cAMP-Konzentrationen nach hydrokinetischen oder ekbolischen Reizen verständlich. Genaue Kenntnisse über die einzelnen Vorgänge liegen noch nicht vor. Für den im Vergleich zu in vivo Bedingungen am isoliert perfundierten Pankreas vorgezogenen Abfall des poststimulatorischen cAMP-Maximums (Abb. 7, 10) und den fehlenden Wiederanstieg nach Beendigung des Sekretionsvorganges sind möglicherweise veränderte Regulationsmechanismen am isoliert perfundierten Organ verantwortlich. Ursache und Bedeutung des auch am Pankreas der Katze (7) beobachteten zweiten cAMP-Gipfels, der im Anschluß an eine Sekretionsphase sowohl nach Sekretin als auch nach Gabe von ekbolischen Sekretagoga auftritt, sind ungeklärt. CASE et. al. (7, 9) bezeichneten dieses Phänomen als Ausdruck einer gesteigerten Resynthese von Enzymproteinen. Auf eine gesteigerte Neubildung von Eiweißmolekülen weist auch die intrazelluläre Anreicherung sowie die Ausscheidung markierter Aminosäuren 30 - 45 Minuten nach der Stimulation hin (2, 50, 64). So könnte der Verlust des zweiten cAMP-Anstieges unter in vitro Bedingungen Ausdruck einer gestörten Neusynthese der Pankreasproteine sein. Bei

Perfusion mit KHB-Lösung ist kein exogenes Substrat für eine Eiweißneubildung vorhanden.

Da Sekretin die Proteinsekretion nicht steigert, läßt sich der erneute Anstieg von cAMP beim Hundepankreas nach Sn-Gabe nicht als Folge einer Enzymneubildung erklären. CHRISTOPHE et.al. (11) und GARDNER et.al. (25, 26) fanden an Azinuszellen und Pankreasteilen der Ratte und des Meerschweinchens nach Gabe von Sekretin bzw. dbcAMP eine gesteigerte Phosphorylierung der Membranproteine. Bei diesen Versuchstieren jedoch führten Sn und VIP zu einer deutlichen ekbolischen Wirkung:

cAMP-Verhalten im calciumfreien Medium

Durch Perfusion mit EDTA-haltiger, calciumfreier Lösung wird das extrazelluläre Calcium nach etwa 30 - 60 Minuten auf ein Minimum reduziert. Die exkretorische Funktion wird dadurch fast vollständig unterbunden. Trotzdem kommt es sowohl nach Sn als auch nach CCK bzw. Ach zu einer deutlichen Zunahme der cAMP-Konzentration, wie aus den Abb. 15, 16 ersichtlich ist. Das zelluläre Verhalten des cAMP bei Perfusion mit calciumfreier Lösung unterscheidet sich nicht wesentlich von dem Verhalten bei Versuchen mit calciumhaltigen Medien. cAMP erweist sich somit als calciumunabhängiger Vermittler extrazellulärer Reaktionen. Die Vermittlerfunktion von cAMP zwischen den Rezeptoren der Plasmamem-

bran und dem Adenylcyclasesystem scheint somit auch im calciumfreien Milieu erhalten zu sein. Im Gegensatz zu exogenem Dibutyryl-cAMP kann durch Sn, CCK und Ach endogen freigesetztes cAMP im calciumfreien Medium allein keinen Sekretionsvorgang einleiten, obwohl es an isolierten Azinuszellen und Pankreasfragmenten auch bei calciumfreier Perfusion zu einem gesteigerten Ca-Ausstrom kommt (8, 11, 24).

Folglich ist für die Hemmung der Enzymsekretion im calciumfreien Milieu mehr der Verlust der extrazellulären Wirkung von Calcium an der Plasmamembran bei der Fusion der Zymogranula im Rahmen der Exocytose, als der intrazelluläre Calciummangel verantwortlich. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phospholipoproteidmembran können sich durch den extrazellulären Calciummangel verändern. Nicht geklärt und angezweifelt (4, 7) wird die Bedeutung eines vermehrten Calciumeinstroms in die Zelle als wichtigster sekundärer Vermittler ekbolischer Sekretagoga (36, 37, 46, 55). Träfe diese Vermittlerfunktion doch zu, so wäre der Verlust oder der verminderte Einstrom von Calcium eine mögliche Ursache für eine Entkoppelung sekretorischer Vorgänge.

Zu einer weiteren Beeinträchtigung der sekretorischen Vorgänge könnte der im calciumfreien Medium etwas erniedrigte cytoplasmatische cAMP-Gehalt führen. Exogenes cAMP bzw. dbcAMP oder Theophyllin können dann die gestörte Sekretion

nicht gänzlich ausgleichen (60).

Im Zusammenhang mit der ekbolischen hydrokinetischen Wirkung von exogenem Dibutyryl-cAMP und Theophyllin (60) sprechen die dargelegten Ergebnisse für eine sekundäre Vermittlerfunktion von cAMP am exokrinen Hundepankreas. Diese Vermittlung betrifft sowohl die Stimulierung ductulärer Zellen durch Sekretin, als auch die azinäre Freisetzung von Enzymen durch ekbolische Sekretagoga. Da sich die Wirkung der hydrokinetischen und ekbolischen Stimulantien an den entsprechenden Target-Zellen des exokrinen Hundepankreas nicht überschneiden, ist ein gemeinsamer "second messenger" in den funktionell und morphologisch unterschiedlichen Zellgruppen durchaus denkbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Untersuchungen in vivo und am isoliert perfundierten Hundepankreas soll die Bedeutung von cyclischem Adenosin 3':5'-monophosphat als zellulärer Vermittler hydrokinetischer und insbesondere ekbolischer Sekretagoga geklärt werden.

Sowohl Sekretin als auch die ekbolischen Sekretagoga Cholecystokinin, Acetylcholin und Caerulein führten in gleicher Weise innerhalb von 30 - 60 Sekunden zu einer deutlichen Zunahme der zellulären cAMP-Konzentration. Nach Stimulierung mit Sekretin ging dieser Anstieg der Saftsekretion voraus, nach ekbolischen Sekretagoga war er mit dem Beginn der Enzymfreisetzung koinzident. Das Maximum an cytoplasmatischem cAMP wurde nach 1 - 3 Minuten erreicht und fiel mit dem exkretorischen Maximum zusammen. Es zeigte sich jedoch keine strenge Dosis-Wirkungsbeziehung zu den hydrokinetischen und ekbolischen Sekretagoga.

Während der zeitliche Ablauf zellulärer cAMP-Veränderungen am isolierten Pankreas weitgehend dem Sekretionsverlauf entsprach, zeigten sich in vivo deutliche Abweichungen. In Bezug auf die Stimulierung mit Sekretin zeigte das cytoplasmatische cAMP-Verhalten nach ekbolischen Sekretagoga keine wesentlichen Unterschiede.

Auch im calciumfreien Medium bei vollständiger Hemmung der exkretorischen Zellfunktion kam es nach Stimulierung mit hydrokinetischen und ekbolischen Sekretagoga zu einem raschen Anstieg der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration.

So zeigt das zelluläre Verhalten von cAMP am Pankreas des Hundes nach Gabe von Sekretin bzw. Cholecystokinin, Acetylcholin und Caerulein eindeutig, daß cAMP sowohl bei der durch ekbolische Sekretagoga stimulierten Enzymfreisetzung azinärer Zellen, als auch bei der sekretinabhängigen Elektrolyt- und Wassersekretion ductulärer Zellen eine intrazelluläre Vermittlerfunktion besitzt. Die endogene Freisetzung von cAMP hängt nicht vom Vorhandensein von extrazellulärem Calcium ab. Letzteres scheint jedoch für die Enzymfreisetzung von Bedeutung zu sein. Unterschiede zwischen dem cytoplasmatischen Verhalten von cAMP und dem jeweiligen Sekretionsverlauf deuten auf weitere Regulationsmechanismen für die zelluläre Homeostase von cAMP hin.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBANO, J.,
BHOOLA, K.D.,
HARVEY, R.F.: Intracellular messenger role of cyclic GMP in exocrine pancreas. *Nature* 262, 404-406 (1976).
2. BANDUIN, H.,
ROCHUS, L.,
VINCENT, D.,
DUMONT, I.E.: Role of cyclic 3': 5'-AMP in the action of physiological secretagogues on the metabolism of rat pancreas in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 252, 171-182 (1971).
3. BENZ, L.,
ECKSTEIN, B.,
MATTHEWS, E.K.,
WILLIAMS, I.A.: Control of pancreatic amylase release in vitro: effects of ions, cyclic AMP, and colchicine. *Br. J. Pharm.* 46, 66-67 (1972).
4. BERRIDGE, M.J.: The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. *Adv. in cyc. Nuc. Res.* 6, ed. P. Greengard and G.A. Robinson. Raven Press, New York (1975).
5. BOLENDER, R.P.: Stereological analysis of guinea-pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells. *J. Cell Biology* 61, 269-287 (1974).
6. CASE, R.M.,
SCRATCHERD, T.: The action of dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and methylxanthines on pancreatic exocrine secretion. *J. Physiol.* 223, 649-667 (1972).

7. CASE, R.M.,
JOHNSON, M.,
SCRATCHERD, T.,
SHERATT, H.S.A.: Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentration in the pancreas following stimulation by secretin, cholecystokinin -pancreozymin and acetylcholine. J. Physiol. 223, 669-684 (1972).
8. CASE, R.M.,
CLAUSEN, T.: The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. J. Physiol. 235, 75-102 (1973).
9. CASE, R.M.: Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. Biol. Rev. 53, 211-354 (1978).
10. CERASI, E.,
LUFT, R.: The pathogenesis of diabetes mellitus. In: Nobel Symposium 13, 17-43, ed. CERASI, E. and LUFT, R., Stockholm, Almquist and Wiksell (1970).
11. CHRISTOPHE, J.,
ROBBERECHT, P.,
DESCHODT-
LANCKMANN, M.,
LAMBERT, M.,
LEEMPUT-CONTREZ, M.,
CAMUS, J.: Molekular basis of enzyme sekretion by the exocrine pancreas. In: Advances in Cytopharmacology, vol.2, ed. CECCARELLI, B., CLEMENTI, F., MELDOLESI, J., 47-61. Raven Press, New York (1974).
12. CHRISTOPHE, J.P.,
CONLON, T.P.,
GARDNER, J.D.: Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Binding of radioiodinated peptide. J. Biol. Chem. 251, 4629-34 (1976).

13. CHRISTOPHE, J.P., Action of cholecystokinin, cholinergic
FRANDSEN, E.K., agents and A 23187 on accumulation of
CONLON, T.P., guanosine 3': 5'-monophosphate in
KRISHNA, G., dispersed guinea pig pancreatic
GARDNER, J.D.: azinar cells.
J. Biol. Chem. 251, 4640-45 (1976).

14. DEAN, P.M., Pancreatic acinar cells: Measurement of
MATTHEWS, E.K.: membrane potential and miniature depolarisation potentials.
J. Physiol. 225, 1-13 (1972).

15. DOCKRAY, G.: The action of secretin, cholecystokinin-pancreozymin and caerulein on pancreatic secretion in rat.
J. Physiol. 225, 679-692 (1972).

16. DOMSCHKE, D., Bicarbonate and cyclic AMP content
DOMSCHKE, W., of pure human pancreatic juice in
RÖSCH, W., response to graded doses of synthetic
KONTUREK, S.I., secretin.
WUNSCH, E., Gastroenterology 70, 533-536 (1976).
DEMLING, L.:

17. DOMSCHKE, D., Cyclic AMP and pancreatic bicarbonate
DOMSCHKE, W., secretion in response to secretin
RÖSCH, W., in dogs.
KONTUREK, S.I., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 150,
WUNSCH, E., 773-779 (1975).
DEMLING, L.:

18. DE PONT, J.J.H.M., Role of pancreatic adenylate cyclase in
LUYBEN, D., secretin stimulated enzyme secretion.
BONTING, S.L.: XI Symposium of European Pancreatic Club
Zürich. Abstr. 1978

19. DESCHODT-
LANCKMANN, M.,
ROBBERECHT, P.,
DE NEEF, P.,
LABRIE, F.,
CHRISTOPHE, J.:
In vitro interactions of gastro-
intestinal hormones on cyclic adenosine
3': 5'-monophosphate levels and amylase
output in the rat pancreas.
Gastroenterology 68, 318-325, (1975).

20. FÖLSCH, U.R.,
CREUTZFELDT, W.:
Pancreatic duct cells in rats:
Secretory studies in response to
secretin, cholecystokinin-pancreozymin
and gastrin in vivo.
Gastroenterology 73, 1053-1059 (1977).

21. FÖLSCH, U.R.,
CREUTZFELDT, W.:
Electrolyte secretion by a pancreatic
duct model in the rat in vivo and accu-
mulation of cyclic adenosine-3': 5'-mo-
nophosphate in vitro in response to
gastrointestinal hormones; in Stimulus-
secretion coupling in the gastro-
intestinal tract. ed. CASE, R.M.,
GOEBELL, H.
William Clowes and Sons, London. 381
(1976)

22. FRANDSEN, E.K.,
KRISHNA, G.:
Life Sci. 13, 529-542 (1976).

23. GARDNER, J.D.,
JACKSON, M.I.:
Regulation of amylase release from
dispersed pancreatic acinar cells.
J. Physiol. London. 270, 439-54 (1977).

24. GARDNER, J.D.,
CONLON, T.P.,
KLAEVEMAN, H.L.,
ADAMS, T.D.,
ONDETTI, M.:
Action of cholecystokinin and
cholinergic agents on calcium transport
in isolated pancreatic acinar cells.
J. Clin. Invest. 56, 366-75 (1975).

25. GARDNER, J.D.: Regulation of pancreatic exocrine function in vitro: Initial steps in the actions of secretagogues.
Ann. Rev. Physiol. 41, 55-66 (1979).
26. GARDNER, J.D.,
CONLON, T.P.,
ADAMS, T.D.: Cyclic AMP in pancreatic acinar cells: Effects of gastrointestinal hormones.
Gastroenterology 70, 29-35 (1976).
27. GILMAN, G.A.: A protein binding assay for adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate.
Proc. Natl. Ac. Sci. 67, 305-312, (1970).
28. HAIG, T.H.B.: Regulation of pancreatic acinar cell function: Effects of cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP, and theophylline in vitro.
Canad. J. Physiol. Pharmac. 52, 780-785 (1974).
29. HAYMOVITS, A.,
SCHEELE, G.A.: Cellular cyclic nucleotides and enzyme secretion in the pancreatic acinar cell.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 156-60 (1971).
30. HEISLER, S.,
GRONDIN, G.: Absence of effects of dibutyryl cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate on release of amylase, ⁴⁵Ca efflux and protein synthesis in rat pancreas in vitro.
Experientia 31, 236-238 (1975).
31. KAPOOR, C.L.,
KRISHNA, G.: A possible role for guanosine 3', 5'-monophosphate in the stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas.
Biochim. Biophys. Acta 544, 102-112 (1978).

32. KELLER, P., The proteins of bovine pancreatic juice.
COHEN, J.E., J. Biol. Chem. 233, 344-349 (1958).
NEURATH, H.:
33. KEMPEN, H.I.M., Rat pancreatic adenylate cyclase.
DE PONT, J.J.H.M., V. Its presence in isolated rat pancrea-
BONTING, S.L.: tic acinar cells.
Biochim. Biophys. Acta 496, 521-531
(1977).
34. KEMPEN, H.I.M., Rat pancreatic adenylate cyclase.
DE PONT, J.J.H.M., IV. Effect of hormones and other agents
BONTING, S.L.: on cyclic AMP level and enzyme
release.
Biochim. Biophys. Acta 496, 65-67
(1977).
35. KNOELL, R.C., Significance of cyclic AMP in the
TOSKES, P.P., regulation of exocrine pancreas
REBER, H., secretion.
BROOKS, F.P.: Experientia 26, 515-517 (1970).
36. KONDO, S., Ca^{++} -fluxes in isolated cells of rat
SCHULZ, I.: pancreas. Effects of secretagogues and
different Ca^{++} - concentrations.
J. Membrane Biol. 29, 185-203 (1976).
37. KONDO, S., Calcium uptake in isolated pancreas
SCHULZ, I.: cells induced by secretagogues.
Biochim. Biophys. Acta 419, 76-92
(1976).
38. KULKA, R.G., Enzyme secretion in mouse pancreas
STERNLICHT, E.: mediated by adenosine-3', 5'-cyclic
phosphate and inhibited by adenosine
-5'-phosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61 1123-1128
(1968).

39. LAMBERT, M.,
CAMUS, J.,
CHRISTOPHE, J.: Phosphorylation in vitro of proteins
in the pancreas and parotides of rats:
Effects of hormonal secretagogues and
cyclic nucleotides.
Biochem. Pharmacology 24, 1755-58
(1975).
40. LEMON, M.I.C.,
BHoola, K.D.: Excitation-secretion coupling in
exocrine glands. Properties of cyclic
AMP phosphodiesterase and adenylate
cyclase from submaxillary gland and
pancreas.
Biochim. Biophys. Acta 385, 101-113
(1975).
41. LONG, B.W.,
GARDNER, J.D.: Effects of cholecystokinin on adenylate
cyclase activity in dispersed pancreatic
acinar cells.
Gastroenterology 73, 1008-14 (1977).
42. LOWRY O.H.,
ROSEBROUGH, N.J.,
FARR, A.L.,
RANDALL, R.C.: Protein measurement with the folin
phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
43. MAROIS, C.,
MORISSET, I.,
DUNNIGAN, I.: Presence and stimulation of adenyl
cyclase in pancreatic homogenate.
Revue Canadienne de Biologie 31,
253-257 (1972).
44. MIYAMOTO, E.,
KUO, I.E.,
GREENGARD, P.: Cyclic nucleotidedependent protein
kinases.
III. Purification and properties of
adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent
protein kinases from bovin brain.
J. biol. Chem. 244, 6395-6402 (1969).

45. RANDLE, P.S., COOPER, R.H., ASHCROFT, S.I.H.: Concentration of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in mouse pancreatic islets measured by a protein-binding Radioassay.
Biochem. J. 134, 599-605 (1973).
46. RASMUSSEN, H., JENSEN, P., GOODMAN, D.B.P.: Interactions between calcium and cyclic nucleotides in control of secretions;
In: Stimulus Secretion Coupling in the Gastrointestinal Tract.
ed CASE R.M. and GOEBELL H.,
William Clowes and Sons, London,
33-49 (1976).
47. RIDDERSTAP, A.A., BONTING, S.L.: Cyclic AMP and enzyme secretion by the isolated rabbit pancreas.
Pflügers Arch. 313, 62-70 (1969).
48. ROBBERECHT, P., DESCHODT-LANCKMANN, M., DE NEEF, P., BORGEAT, P., CHRISTOPHE, J.: In vivo effects of pancreozymin, secretin, vasoactive intestinal polypeptide and pilocarpine on the levels of cyclic AMP and cyclic GMP in the rat pancreas.
FEBS Letters 43, 139-143 (1974).
49. ROBBERECHT, P., CONLON T.P., GARDNER, J.D.: Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig.
J. Biol. Chem. 251, 4635-39 (1976).
50. ROBBERECHT, P., CREMER, M., CHRISTOPHE, J.: Discharge of newly synthesized proteins in pure juice collected from the human pancreas.
Gastroenterology 72, 417-420 (1977).

51. ROBBERECHT, P.,
DESCHODT-
LACKMANN, M.,
LAMMENS, M.,
DE NEEF, P.,
CHRISTOPHE, J.: In vitro effects of secretin and
vasoactive intestinal polypeptide on
hydrolase secretion and cyclic AMP
levels in the pancreas of five animal
species. A comparison with caerulein.
Gastroenterologie clinique et biologique
1, 519-523 (1977).
52. ROBBERECHT, P.: The role of cyclic nucleotides in
pancreatic enzyme and electrolyte
secretion.
In: Stimulus Secretion Coupling in the
Gastrointestinal Tract.
ed. CASE, R.M., and GOEBELL H.;
William Clowes and Sons,
London, 203-226 (1976).
53. ROBBERECHT, P.,
DESCHODT-
LANCKMANN, M.,
CAMUS, M.,
CHRISTOPHE, J.: Specific binding and mode of action
of caerulein on plasma membranes of
rat pancreas.
In: Hormonal Receptors in Digestive
Tract Physiology.
ed. BONFILS, P., FROMAGEOT, P.,
ROSSELIN, G., 261-274
Amsterdam (1977).
54. RUTTEN, W.J.,
DE PONT, J.J.H.M.,
BONTING, S.L.: Adenylate cyclase in the rat pancreas.
Properties and stimulation by hormones.
Biochim. Biophys. Acta 274, 201-213
(1972).
55. SCHULZ, I.: The role of extracellular Ca^{++} and
cyclic nucleotides in the mechanism
of enzyme secretion from the cat
pancreas.
Pflügers Archiv Europ. J. Physiol.
360, 165-181 (1975).

56. SINGER, M.,
CAILLA, H.: Cyclic GMP, cyclic AMP, protein and bicarbonate secretion in pure pancreatic juice: dose-response-curves to cholecystokinin-pancreozymin in dogs. INSERM Symposium 3, ed. BONFILS et al., Elsevier / North Holland, Biomedical Press, 301-309 (1977).
57. SJODIN, L.,
GARDNER, J.D.: Effect of cholecystokinin variant (CCK₃₉) on dispersed acinar cells from guinea pig pancreas. Gastroenterology 73, 1015-1018 (1977).
58. SUTHERLAND, E.W.,
RALL, T.W.: The relation of adenosine 3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 3, 265-299 (1960).
59. SVOBODA, M.,
ROBBERECHT, P.,
CAMUS, J.,
DESCHODT-
LANCKMANN, M.,
CHRISTOPHE, J.: Association of binding sites for guanine nucleotides with adenylate cyclase activation in rat pancreatic plasma membranes. Eur. J. Bioch. 83, 287-297 (1978).
60. TEUFEL, H.,
SKAMBRAS, M.,
FORELL, M.M.: Die Wirkung von exogenen cyclischen Nucleotiden und Theophyllin auf die hydrokinetische und ekbolische Funktion des isoliert perfundierten Hundepankreas. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 469-479 (1981).
61. TEUFEL H.,
STOCK, P.,
ROHRMOSER, H.,
FORELL, M.M.: Der Einfluß des extrazellulären Calciums auf die Saft-, Enzym- und Calciumsekretion des isoliert perfundierten Hundepankreas. Res. exp. Med. 169, 221-241 (1977).

62. TRABER, I.: Prostaglandinsynthese und Prostaglandinwirkung bei clonalen permanenten Zelllinien des Nervensystems.
Diploma Thesis 1973, LMU München.
63. VAGNE, M.,
GROSSMAN, M.I.: Comparison of intravenous and subcutaneous secretion in dogs.
Gastroenterology 54, 907-912 (1968).
64. WEBSTER, P.D.: Hormonal control of pancreatic acinar cell metabolism.
In: The exocrine glands, ed. BOTHELO S.Y., BROOKS, F.P., SHELLEY, W.B., pp. 153-169, Philadelphia: Pennsylvania Press (1969).
65. WORMSLEY, K.G.: Responses to secretin and pancreozymin in man.
J. Physiol. 203, 53-54 (1969).
66. WORMSLEY, K.G.: Physiological control of pancreatic secretion.
In: Scientific basis of Gastroenterology ed. DUTHIE, H.L. and WORMSLEY K.G., Churchill-Livingstone, London (1978).

Herrn Privatdozent Dr. H. Teufel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit mit Rat und Tat.

Meinen Kollegen, Herrn K. Go und Herrn W. Joseph, sowie Frau F. Hamzei-Gutowski und Frau U. Böttcher als medizinisch-technische Assistentinnen sei für ihre freundliche und unentbehrliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente gedankt.

L E B E N S L A U F

Am 15. Juni 1948 wurde ich, Berthold Liebig, als Sohn des Steuerbevollmächtigten Berthold Liebig und seiner Ehefrau Rosa, geb. Heinzl, in Moosham, Kreis Mühldorf/Inn, geboren.

1954 - 1959	Besuch der Grundschule in Kaufbeuren-Neugablonz.
1959 - 1969	Staatl. mathem.-naturw. Gymnasium in Kaufbeuren. Dort im Juni 1969 Abitur.
1969 - 1970	Ableistung des Wehrdienstes.
Oktober 1970	Beginn des Studiums der Fachrichtungen Chemie und Biologie an der TU - München.
April 1971	Zulassung für das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Oktober 1972	Zusätzliche Aufnahme des Zahnmedizin-Studiums.
25. April 1979	Ärztliche Prüfung an der Universität München.
11. Mai 1979	Zahnärztliche Prüfung an der Universität München.
Nov. 1979 bis Jan. 1981	Medizinalassistent und anschließend Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus in Roding/Oberpfalz.
5. Februar 1981	Approbation als Arzt.
Feb. 1981 bis Mai 1986	Wissenschaftlicher Assistent an der Abteilung für Kiefer- und Gesichtschirurgie im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
20. Juni 1984	Anerkennung als Mund-Kiefer-Gesichtschirurg.
2. Mai 1986	Promotion zum Doktor der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mit einer Arbeit zum Thema: Die schräge Osteotomie nach Schuchardt-Perthes im Hinblick auf Nervenschädigungen
6. August 1986	Genehmigung zum Führen der Zusatzbezeichnung: PLASTISCHE OPERATIONEN
Juni 1986 bis April 1987	Ärztliche und zahnärztliche Praxisvertretungen
26. Jan. 1987	Eintragung in das Arztregister

Seit Sept. 1972 bin ich verheiratet und habe 2 Kinder.

